# Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Zuckerderivate auf die Synthese cellulolytischer Enzyme in **Trichoderma reesei**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Hans-Peter Hohn
aus Steinstraß

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

# Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Zuckerderivate auf die Synthese cellulolytischer Enzyme in **Trichoderma reesei**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Hans-Peter Hohn
aus Steinstraß

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H. Sahm
Korreferent: Prof. Dr. C. Hollenberg
Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juni 1983

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Biotechnologie 1 der Kernforschungsanlage Jülich GmbH ausgeführt.

Mein Dank gilt insbesondere Herrn Prof. Dr. H. Sahm für die Überlassung des Themas, seine intensive Betreuung sowie seine stets konstruktive Kritik.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern des Instituts, die mir durch ständige Diskussionsbereitschaft und Ratschläge zur Lösung technischer Probleme die Arbeit erleichtert haben.

Besonderer Dank gebührt Herrn Dr. K. Hamacher für die Synthese verschiedener Testsubstanzen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543915_0086

Abkürzungen

| | |
|---|---|
| CMC | Carboxymethylcellulose |
| CMCase | Carboxymethylcellulase |
| CM-Cellulase | Carboxymethylcellulase |
| D | Durchflußrate = Verdünnungsrate ($h^{-1}$) |
| E | Extinktion |
| $\Delta E$ | Extinktionsänderung |
| g | Erdbeschleunigung |
| $K_i$ | Inhibitorkonstante |
| $K_M$ | Michaelis-Menten-Konstante |
| MN 300 | Cellulosepulver MN 300 |
| NAD(H) | Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert) |
| NADP(H) | Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (reduziert) |
| p-NPG | para-Nitrophenyl-ß-D-glucopyranosid |
| S | Substratkonzentration |
| S 300 | Sephacryl-S 300 |
| U | Enzymeinheit (Unit) |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| V | Reaktionsgeschwindigkeit |
| $V_{max}$ | maximale Reaktionsgeschwindigkeit |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| v/vm | Volumen pro Volumen pro Minute |
| w/v | Gewicht pro Volumen |

Inhaltsverzeichnis


I. Einleitung . . . . . 2

II. Material und Methoden. . . . . 10
1. Versuchsorganismus . . . . . 10
2. Chemikalien. . . . . 11
3. Nährmedien . . . . . 12
4. Kulturbedingungen. . . . . 13
5. Herstellung gewaschener Myzelien . . . . . 16
6. Herstellung von zellfreien Enzymlösungen . . . . . 16
7. Proteinbestimmungen. . . . . 16
8. Bestimmung von Zuckern und Zuckerderivaten . . . . . 19
9. Bestimmung von Enzymaktivitäten. . . . . 28
10. Anreicherung und Differenzierung der Cellobionsäure-hydrolase. . . . . 31

III. Ergebnisse . . . . . 36
1. Wachstum und Enzymbildung auf Glucose und Glycerin . . 36
2. Wachstum und Enzymbildung auf Cellulose. . . . . 38
3. Wachstum und Enzymbildung auf Cellobiose . . . . . 42
4. Wechselwirkungen zwischen Cellobiosederivaten und cellulolytischen Enzymen . . . . . 46
5. Induktion cellulolytischer Enzyme durch synthetische Glucosederivate. . . . . 74
6. Induktion durch Disaccharide, die sich nicht von Cellulose ableiten lassen. . . . . 80

IV. Diskussion . . . . . 88

V. Zusammenfassung. . . . . 98

VI. Literaturverzeichnis . . . . . 101

## I. EINLEITUNG

Die fortschreitende Erschöpfung herkömmlicher Rohstoffe und Energieträger hat in den letzten Jahren eine intensivierte Suche nach neuen Energie- und Rohstoffquellen verursacht. Ein besonderes Interesse fand dabei das meistgebildete Makromolekül der Natur - die Cellulose. Bei der Synthese pflanzlicher Biomasse wird soviel Cellulose gebildet, daß bei einer jährlichen Nettoproduktion von ca. $10^{11}$ t pro Kopf der Erdbevölkerung täglich 65 kg Cellulose zur Verfügung stehen (LINKO, 1977; SPANO, 1976). Bisher werden aber nur 4 % der gesamten pflanzlichen Biomasse wirtschaftlich verwertet (SAHM, 1978; SAHM und SCHOBERTH, 1978/79), so daß weiterhin ein großes Potential ungenutzter Energie- und Rohstoffträger zur Verfügung steht.

Der Nutzung der Cellulose sind durch deren mechanische Festigkeit und Wasserunlöslichkeit Grenzen gesetzt. Die Ursachen für diese Eigenschaften liegen in der Struktur der Cellulose begründet. Das Cellulosemolekül ist ein Polymerisat aus D-Glucose, die ß-1,4-glycosidisch zu hochmolekularen unverzweigten Ketten verknüpft ist (SIHTOLA und NEIMO, 1975). Die Ketten werden durch Wasserstoffbrücken zwischen den Glucoseresten stabilisiert (Abb. 1)

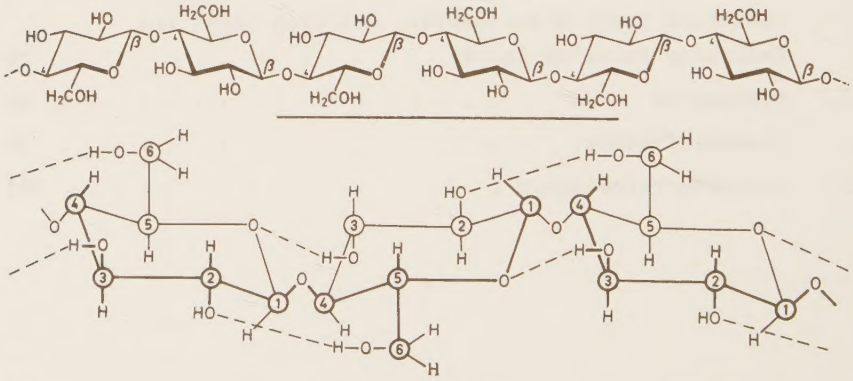


Abb. 1: Struktur des Cellulosemoleküls in räumlicher Darstellung; unten sind die Wasserstoffbrücken als gestrichelte Linien eingezeichnet; die numerierten Kreise sind Kohlenstoffatome (nach LIBBERT, 1975)

Native Cellulose besteht je nach Herkunft aus 8000 - 12000 Glucose-Einheiten in Anhydroverbindung. Das entspricht einem Molekulargewicht von 1,3 - 2,0 x $10^6$ Dalton. Die Polymerfäden von ca. 5 $\mu$m Länge bilden durch parallele Anlagerung, Ausbildung zahlreicher Wasserstoffbrücken untereinander und van-der-Waalscher Kräfte Elementarfibrillen mit unterschiedlich kristallinem Charakter (SIHTOLA und NEIMO, 1975; COWLING, 1975; REESE, 1976). In den kristallinen Bereichen sind die Cellulosemoleküle sowohl achsen- als auch flächenparallel ausgerichtet, während die Fäden in den parakristallinen Bereichen nur einfach verwoben sind oder höchstens achsenparallel verlaufen.

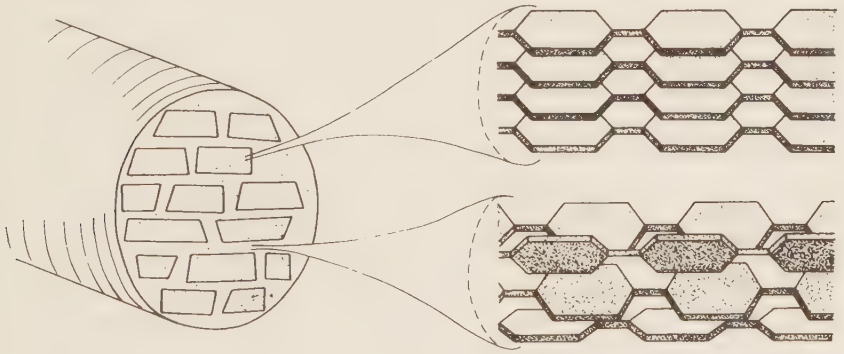


Abb. 2: Strukturmodell einer Elementarfibrille von Cellulose.
Links: Querschnitt mit Micellen (kristallinen Bereichen) und Intermicellarräumen (parakristallinen Bereichen);
Rechts: Modell der Lagerung der Cellulosemoleküle (von jedem Molekül 3 Glucosereste sichtbar): achsen- und flächenparallel in den Micellen (oben), nur achsenparallel in den Intermicellarräumen (unten) (nach LIBBERT, 1975).

Die Abb. 2 nach LIBBERT (1975) vermittelt wahrscheinlich auch nur ein Modell der Cellulosestruktur, während über die exakte Struktur - vor allem im Übergang zwischen kristallinen und amorphen Bereichen - noch keine Einigkeit besteht (COWLING und KIRK, 1976; HESS et al., 1957; MANLEY, 1964; PRESTON und CRONSHAW, 1958). Nur die amorphen Bereiche sind für Wasser zugänglich und somit quellbar. Auf der Unquellbarkeit der kristallinen Be-

reiche beruhen also die mechanische Festigkeit und die chemische Beständigkeit der Cellulose.

Schon um 1900 hatte man die Bedeutung der Cellulose als Quelle für Glucose erkannt und erste Verfahren für die Säurehydrolyse entwickelt. Doch wenn auch die Technologie weiter verbessert werden konnte, so ist das Verfahren immer noch mit schwerwiegenden Nachteilen verbunden. Denn infolge der hohen Säurekonzentrationen in Verbindung mit hohen Temperaturen kann man nur Apparaturen verwenden, die besonders gegen Korrosion geschützt sind. Ferner führt der Prozeß zur Bildung von Nebenprodukten, weil das Ausgangsmaterial je nach Herkunft neben der Cellulose noch verschiedene Begleitsubstanzen enthält. Außerdem kann eine Zersetzung des Produkts Glucose nicht ausgeschlossen werden (RYU und MANDELS, 1980).

Das Spektrum der biotechnologischen Nutzbarkeit von Cellulose reicht vom partiellen mikrobiellen oder enzymatischen Abbau zur Bereitung von Futtermitteln über die aerobe oder anaerobe mikrobielle Fermentation bis hin zur enzymatischen Hydrolyse mit Hilfe zellfreier oder gereinigter Cellulasepräparate. Diese Verfahren können alle bei niedrigen Temperaturen in einfachen Fermentern durchgeführt werden. Besonders vorteilhaft ist die Möglichkeit der gezielten Hydrolyse von Cellulose durch Cellulasepräparate.

Vor allem höhere Pilze und einige andere Mikroorganismen enthalten ein sogenanntes vollständiges Cellulase-System, d.h. sie sind in der Lage, auch die kristallinen Bereiche der Cellulose abzubauen (AUGUSTIN et al., 1981). Doch obwohl inzwischen eine Vielzahl cellulolytischer Enzymsysteme beschrieben und deren Bestandteile charakterisiert wurden, ist der Mechanismus des Celluloseabbaus noch immer Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion. Einen Überblick vermittelt Abb. 3 nach WAGNER und SISTIG (1979).

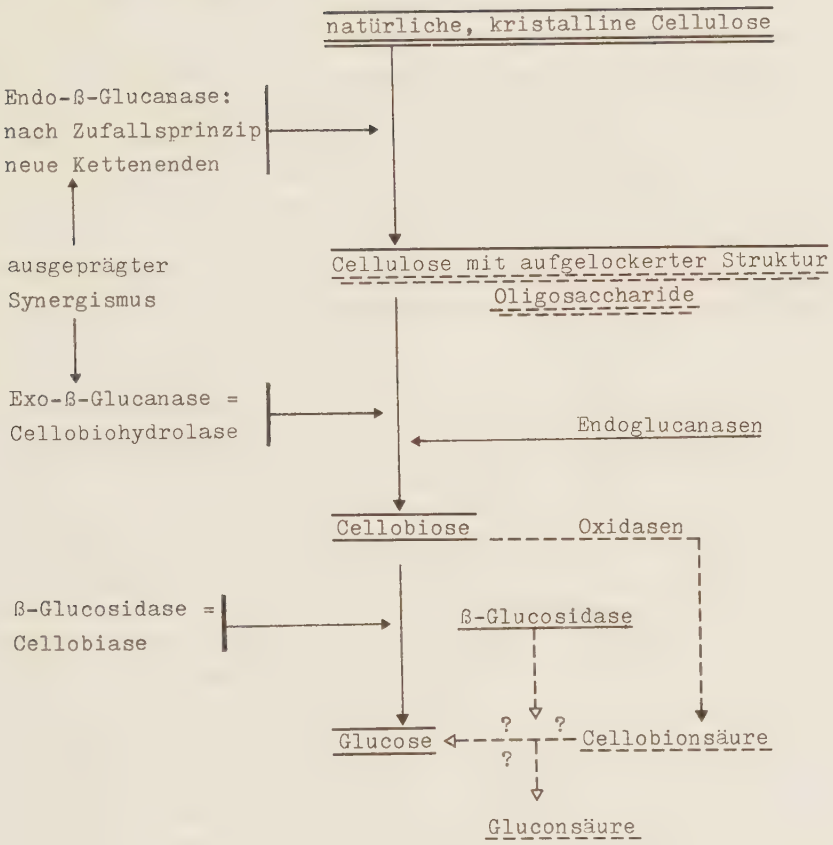



Abb. 3: Schema des Celluloseabbaus und der daran beteiligten Enzyme nach WAGNER und SISTIG (1979)

Gemäß der ersten Hypothese von REESE (REESE et al., 1950; REESE, 1957; SIU und REESE, 1953) lockert zuerst ein nichthydrolytisches sogenanntes $C_1$-Enzym die kristalline Struktur auf und bereitet so den Abbau durch die hydrolytischen $C_x$-Enzyme vor. Diese Vorstellung gilt heute als überholt. Man nimmt in erster Linie nur hydrolytische Enzyme an und unterscheidet lediglich zwischen Exo-ß-1,4-glucanase oder auch ß-1,4-Glucan-cellobiohydrolase (E.C. 3.2.1.91), Endo-ß-1,4-glucanase oder auch ß-1,4-Glucan-glucanohydrolase (E.C. 3.2.1.4) und ß-Glucosidase oder auch Cellobiase (E.C. 3.2.1.21) (ERIKSSON und PETTERSON, 1975 a,b; HALLIWELL und GRIFFIN, 1973; SELBY, 1968; WOOD, 1972/75). Allerdings werden unterschiedliche Meinungen vertreten, ob und wie diese in ein System mit $C_1$- und $C_x$-Enzymen einzuordnen sind (ENARI und MARKANEN, 1977; SPANO, 1976). Während WOOD und McCRAE (1972) die $C_1$-Komponente von *Trichoderma koningii* als ß-1,4-Glucan-cellobiohydrolase beschrieben, und GHAI (1979) eine Endoglucanase des gleichen Organismus als $C_1$-Faktor identifizierte, ist man heute der Überzeugung, daß Endoglucanasen zuerst in amorphen Bereichen der Cellulose angreifen und so freie Kettenenden für die Exoglucanasen zugänglich machen. Durch den Abbau der parakristallinen Bereiche werden dann auch freie Kettenenden im Randbezirk der kristallinen Strukturen geschaffen und so für Exoglucanasen erreichbar, so daß kristalline Bereiche vom Rand her abgebaut werden können (MANDELS, 1982). Das heißt also, daß der Begriff des $C_1$-Faktors die Beschränkung auf ein spezifisches Enzym wie bei REESE verloren hat, aber dennoch die Einleitung des Cellulose-Abbaus bezeichnen kann. Eine weitere Erklärung hierzu ergibt sich aus der Adsorption der Cellulasen an das Substrat, die wegen der Unlöslichkeit von Cellulose immer erfolgen muß (BINDER und GHOSE, 1978; NUMMI et al., 1981). Durch die Anlagerung könnte nach WOOD und McCRAE (1977, 1978) eine lokale Auflockerung der kristallinen Struktur infolge der Spaltung von Wasserstoffbrücken erfolgen. Trifft dies zu, so ähnelt das Konzept der Annahme von REESE (1950).

Die meisten untersuchten Organismen synthetisierten mehrere Endoglucanasen, aber nur eine Exoglucanase (ALMIN et al., 1975; ERIKSSON und PETTERSON, 1975; STREAMER et al., 1975; PETTERSON, 1975). Endoglucanasen hydrolysieren die glycosidischen Bindungen an zufällig verteilten Angriffspunkten im gesamten Cellulosemolekül. An den nichtreduzierenden Kettenenden greifen Exoglucanasen an und setzen Cellobiose frei (ERIKSSON, 1978). WOOD und McCRAE (1977) vermuten, daß Endo- und Exo-glucanasen auf der Oberfläche der Cellulose Enzymkomplexe formen und so eine sequentielle Wirkung ermöglichen. Auf diesem Wege entstehen über die Bildung von größeren Bruchstücken und Oligosacchariden Cellobiose und Glucose. Die Cellobiose wird von einer oder mehreren ß-Glucosidasen zu Glucose hydrolysiert.

Die ß-Glucosidase ist nicht das einzige Enzym, das die Cellobiose umsetzt. So konnte bei verschiedenen Organismen eine Cellobiose:Chinon Oxidoreduktase, auch Cellobiosedehydrogenase genannt, nachgewiesen werden, welche die Cellobiose zur Cellobionsäure oxidiert (WESTERMARK et al., 1974 a,b, 1975; TARGONSKI und SZAJER, 1979; DEKKER, 1980; COUDRAY et al., 1982). Sauerstoff konnte dabei als Elektronenakzeptor ausgeschlossen werden. Bei *Sporotrichum pulverulentum* fanden AYERS et al. (1978) ferner eine $O_2$-abhängige Cellobioseoxidase, deren Existenz bei *Trichoderma reesei* ebenfalls diskutiert wird (ERIKSSON, 1978), jedoch noch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Der weitere Abbauweg der Cellobionsäure ist in den meisten Fällen noch nicht geklärt. Bei *Aspergillus niger* wird sie durch ß-Glucosidasen unter Mitwirkung einer Lactonase hydrolysiert (BRUCHMANN und MARKIANOS, 1969; MOELLER, 1973). Die Lactonase ist erforderlich, weil sowohl Cellobionsäure als auch Gluconsäure mit ihren Lactonformen im Gleichgewicht stehen, die eine Inhibition der Hydrolyse verursachen.

Eine wichtige regulatorische Funktion beim enzymatischen Abbau von Cellulose (Abb. 3) übernehmen die ß-Glucosidasen, die wie die meisten Cellulasen meist Glycoproteine sind (BERGHEM und PETTERSON, 1974; GRITZALI und BROWN, 1979; GONG et al., 1977; SPIRO, 1970; RYU und MANDELS, 1980; ERIKSSON, 1978; MANDELS,

1982). Sie spalten die Cellobiose, welche die Exoglucanase hemmt, und fördern so den Celluloseabbau. Sie werden aber selbst durch Glucose und auch durch hohe Cellobiosekonzentrationen inhibiert, so daß der Substratumsatz an den Bedarf der Organismen angepaßt wird. Für die beiden oxidativen Enzyme werden ebenfalls regulatorische Aufgaben diskutiert (AYERS et al., 1978; WESTERMARK et al., 1975). Danach machen sie die hydrolytischen Reaktionen der Cellulolyse infolge der Veränderung an den reduzierenden Enden der Cellulosebruchstücke irreversibel.

Die Enzyme des Cellulase-Komplexes werden beim Wachstum auf Cellulose und auf oligomeren Derivaten induktiv gebildet, wobei der Induktor durch eine geringe konstitutive cellulolytische Grundaktivität freigesetzt wird (MANDELS und STERNBERG, 1976). In Experimenten mit radioaktiv markierten Aminosäuren konnten NISIZAWA et al. (1971) nachweisen, daß tatsächlich eine Induktion stattfindet, also eine Neusynthese von Enzymprotein erfolgt und die Aktivitätszunahme nicht auf der Aktivierung von bereits gebildeten Proteinen basiert. Außerdem zeigten CHAPMAN und LOEWENBERG (1976), daß im Zusammenhang mit der Induktion eine Steigung der Aktivität des rauhen endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparats mit anschließender Exocytose erfolgt. Durch Antibiotika wird die Synthese von Cellulasen in Gegenwart eines Induktors sowohl auf der Ebene der Transkription als auch der Translation unterbunden (NISIZAWA et al., 1971 b, 1972). Bis heute besteht jedoch noch keine Klarheit über den Mechanismus der Induktion von Cellulasen, wie auch über die Struktur des natürlichen Induktors (MANDELS, 1982).

Eine Aufklärung der Induktion von cellulolytischen Enzymen erscheint besonders für *Trichoderma reesei* erstrebenswert, da dieser Organismus als einer der besten Cellulaseproduzenten bekannt ist. In diesem Zusammenhang und auch für die kommerzielle Nutzung von Cellulasen wäre es wertvoll, wenn ein der Cellulose gleichwertiger Induktor gefunden werden könnte, der nicht abgebaut wird wie alle niedermolekularen Cellulosederivate.

Das beste bekannte Beispiel für ein solches Verhalten ist die Induktion von ß-Galactosidasen in *Escherichia coli* durch Isopropyl-thiogalactosid. Dieses synthetische Analogon von Lactose - dem eigentlichen Substrat des Enzyms - führt zu höheren Enzymaktivitäten als Lactose selbst. Außerdem konnte gezeigt werden, daß innerhalb der Zellen die Lactose in ein anderes Galactosid, die Allolactose, umgewandelt werden muß, welches die wirklich induzierende Verbindung ist (MONOD, 1956). Demzufolge ist Lactose, anders als das synthetische Analogon, das der Allolactose wesentlich ähnlicher ist, kein Induktor der ß-Galactosidase.

In Anlehnung an diese Arbeit von MONOD (1956) kann man annehmen, daß Cellobiose und andere Oligomere von Cellulose bei *Trichoderma reesei* keine direkte Induktion von Cellulasen bewirken. Denn im Vergleich zur Cellulose haben diese Substanzen bei *Trichoderma reesei* nur einen schwachen Effekt, während Cellobiose bei anderen Organismen eine gute Wirkung zeigt (CANEVASCINI et al., 1979; ERIKSSON und HAMP, 1978; STERNBERG und MANDELS, 1979; MANDELS et al., 1960, 1962). Eine Bestätigung findet diese Vorstellung in der Sophorose. Diese tritt beim Abbau von Cellulose als Transglycosylierungsprodukt auf und induziert erheblich höhere Cellulaseaktivitäten als Cellobiose (MANDELS, 1982; MANDELS et al., 1962).

Der Grundgedanke der vorliegenden Arbeit war die These, daß in *Trichoderma reesei* der eigentliche Induktor der Cellulasen aus oligomeren Celluloseprodukten gebildet werden muß. Durch den Einsatz synthetischer Analoge zu Glucose und Cellobiose sollten neue Erkenntnisse über die Induktion von Cellulasen gewonnen werden. Nach Möglichkeit sollte ein der Cellulose gleichwertiger Induktor gefunden werden, der durch den Organismus nicht abgebaut wird und daher wiedergewonnen werden kann.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Versuchsorganismus

*Trichoderma reesei* QM 9414 mit der ATCC-Nummer 26921 ist durch Mutation aus der zunächst mit *Trichoderma viride* QM 6 bezeichneten Mutante von *Trichoderma viride* hervorgegangen. Beim zweiten mycologischen Kongress in Tampa, Florida, wurden *Trichoderma viride* QM 6 und alle Folgemutanten in *Trichoderma reesei* umbenannt (SIMMONS, 1977). Die Gattung *Trichoderma*, von der bisher noch keine sexuellen Stadien gefungen werden konnten, gehört nach DOMSCH u. GAMS (1970) zu den Phialosporen bildenden Deuteromyceten. Das Myzel (Abb. 4) ist weiß-grau und besteht aus septierten, verzweigten Hyphen von 2-3 $\mu$m Durchmesser. Die Sporulation erfolgt auf Agarplatten nach 3-5 Tagen, ist jedoch in Submerskulturen meist stark reduziert. Die meergrünen Sporen sind glatt und eiförmig, ihre Länge beträgt ca. 5 $\mu$m.

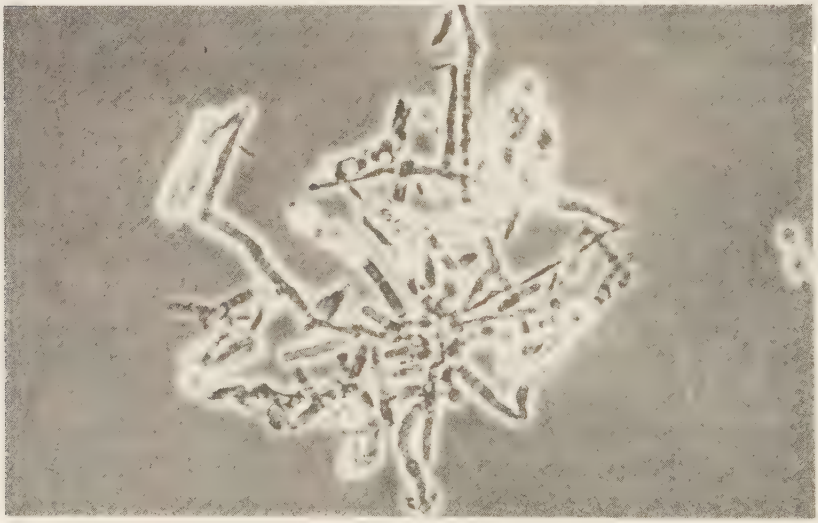


Abb. 4: Phasenkontrastaufnahme von *Trichoderma reesei* QM 9414 (1000-fache Vergrößerung, Photo SPREY). Sporulierendes Myzel in engem Kontakt mit Cellulose wachsend

## 2. Chemikalien

Außer den hier aufgeführten Substanzen wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt verwendet.

| | |
|---|---|
| ß-Alanin | Serva, Heidelberg |
| Acrylamid | Serva, Heidelberg |
| Aminex AG 1 x 4 | Bio-Rad Lab., München |
| Aminex DA - X4 - 20 | Bio-Rad Lab., München |
| Avicel - Cellulose PH; Korngröße ca. 0,038 mm | Serva, Heidelberg |
| Bacto-Agar | Difco Lab., Detroit, USA |
| Bisacrylamid (N,N',methylen-bis-acrylamid) | Serva, Heidelberg |
| Blaudextran | Pharmacia, Uppsala, Schweden |
| Carboxymethylcellulose (CMC); Na-Salz; MG = ca. 100 000; Veretherung ca. 0,7 % | Serva, Heidelberg |
| Cellobiose für Nährmedien | Serva, Heidelberg |
| Cellobiose als Enzymsubstrat | Merck, Darmstadt |
| Cellulosepulver MN 300, zur Dünnschichtchromatographie; Korngröße 0,002 - 0,020 mm | Macherey, Nagel u. Co, Düren |
| Coomassie-Brillant Blau R 250 | Serva, Heidelberg |
| Cytochrom C | Serva, Heidelberg |
| Desoxynojirimycin (1-Desoxy-5-amino-D-pyranose) | von der Fa. Bayer, Wuppertal zur Verfügung gestellt |
| Dichlorfluorescein | Serva, Heidelberg |
| D-Galactonolacton | Sigma, München |
| Glycin | Serva, Heidelberg |
| Hefeextrakt | Difco Lab., Detroit, USA |
| Isopropyl-thiogalactopyranosid | Serva, Heidelberg |
| Methyl-ß-D-glucopyranosid | Serva, Heidelberg |
| p-Nitrophenyl-ß-D-glucopyranosid | Serva, Heidelberg |
| Polypropylenglycol | Roth, Karlsruhe |
| Proteose Peptone | Difco Lab., Detroit, USA |
| Riboflavin (5'Phosphat) | Serva, Heidelberg |
| Sephacryl S-300 | Pharmacia, Uppsala, Schweden |

| | |
|---|---|
| ß-Sophorose | Serva, Heidelberg |
| TEMED (N,N,N',N',Tetramethyl-ethylendiamin) | Serva, Heidelberg |
| Thioglycolsäure | Serva, Heidelberg |
| Tween 80, M 1300 | Serva, Heidelberg |

Cellobionsäure, Isopropyl-thioglucopyranosid, Tetramethyl-gluconolacton und Thiocellobiose wurden von Herrn Dr. K. Hamacher (IBT der KFA Jülich) synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3. Nährmedien

a) Komplettmedium - für Agarplatten und Schrägagarröhrchen zur Anzucht und Stammhaltung des Pilzes:

| | |
|---|---|
| Hefeextrakt | 4 g |
| Malzextrakt | 10 g |
| Glucose | 4 g |
| Bacto-Agar | 20 g |
| Aqua dest. | ad 1000 ml |

Der pH wurde auf 5 eingestellt.

b) Minimalmedium - für Submerskulturen (nach VAHERI, VAHERI und KAUPPINEN (1979), MANDELS und REESE (1957, 1960)):

| | | |
|---|---|---|
| $KH_2PO_4$ | 2,0 | g |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 1,4 | g |
| Harnstoff | 0,3 | g |
| $CaCl_2 \times 2\ H_2O$ | 0,38 | g |
| $MgSO_4 \times 7\ H_2O$ | 0,3 | g |
| $FeSO_4 \times 7\ H_2O$ | 5,0 | mg |
| $MnSO_4 \times H_2O$ | 1,6 | mg |
| $ZnSO_4$ | 1,4 | mg |
| $CoCl_2$ | 2,0 | mg |
| Proteose Peptone | 0,75 | g |
| Tween 80 | 2,0 | ml |
| Aqua dest. | ad 1000 | ml |

Der pH wurde auf 5 eingestellt

Die Medien wurden 20 Minuten im gespannten Dampf bei 120 °C autoklaviert. Alle Kohlenstoffquellen außer Cellulose wurden separat autoklaviert oder wie $CaCl_2$ und Harnstoff über Millipore Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße sterilfiltriert. Abweichungen von diesem Medium werden im Text angegeben.

4. Kulturbedingungen

a) Feste Nährböden
Agarplatten und Schrägagarröhrchen wurden mit Myzel- und Sporenmaterial von bewachsenen Schrägagarröhrchen per Impföse beimpft und bei 27 °C inkubiert. Nachdem die gesamte Agar-Oberfläche gleichmäßig bewachsen war, wurde das Material bis zur Weiterverwendung bei 4 °C gelagert. Zur Stammhaltung wurden Schrägagarröhrchen alle 6 - 8 Wochen übergeimpft.

Zur Herstellung einer Sporensuspension wurden in einem 500 ml-Erlenmeyerkolben 150 ml Komplettmedium nach dem Beimpfen inkubiert bis die gesamte Oberfläche einheitlich mit gut sporulierendem Myzel bewachsen war. Anschließend wurden die Sporen mit Saline (0,9 % NaCl) unter Schütteln mit Glaskugeln (Ø = 4 mm) abgeschwemmt und unter sterilen Bedingungen durch Glaswolle filtriert, um Myzelrückstände abzutrennen. Die Sporenkonzentration wurde in einer Zählkammer nach THOMA bestimmt und gegebenenfalls auf $10^8$ Sporen pro ml verdünnt. Die Suspension wurde im Gefrierschrank bei - 20 °C gelagert.

b) Schüttelkulturen
Alle Kulturen wurden bei 27 °C auf einer rotierenden Schüttelmaschine bei 100 Upm gezüchtet. Erlenmeyerkolben der folgenden Größen wurden verwendet: 100 ml-Kolben mit 20 ml Medium, 500 ml-Kolben mit 100 ml Medium, 2 l-Kolben mit 500 ml Medium. Um eine bessere Durchmischung und Belüftung zu erreichen, hatten die 500 ml- und 2 l-Kolben je zwei seitliche Einbuchtungen im Bodenbereich (Schikanen). Die 20 ml-Kulturen wurden mit der Impföse von gleichmäßig bewachsenen Agarplatten beimpft. Nach zweitägiger Inkubation dienten solche als Inokulum für 500 ml-Kulturen.

100 ml Medium wurden mit 1 ml einer Sporensuspension mit ca. $10^8$ Sporen pro ml inokuliert. Bei Bedarf wurde der pH täglich mit 1 N NaOH und 1 N HCl auf pH 4 - 5 nachgestellt.

Bei Versuchen mit gewaschenen Myzelien wurden 50 ml Portionen von gewaschenen Myzelien in sterile 500 ml-Erlenmeyerkolben gegeben. Die Kulturen wurden durch die Zugabe der Testsubstanzen gestartet, die in 1 ml Lösung konzentriert durch Ultrafiltration sterilisiert worden waren. Alle Testsubstanzen wurden in Konzentrationen von $10^{-7}$ M bis $10^{-2}$ M eingesetzt. Dabei enthielt eine Serie nur die zu untersuchende Substanz, während einer zweiten noch 0,2 % Glycerin zugesetzt wurde, um den Organismus zur Synthese von Enzymprotein zu befähigen, falls ein möglicher Induktor nicht metabolisiert werden konnte. Auf Glycerin selbst werden nach VAHERI et al. (1979) und MANDELS und REESE (1960) keine cellulolytischen Enzyme gebildet. In allen Versuchen enthielt jede Serie eine Kultur ohne Testsubstanz zur Kontrolle.

Sämtliche Versuche mit gewaschenen Myzelien wurden bei pH 3 durchgeführt, da dieser Bereich nach STERNBERG u. MANDELS (1979, 1980), REESE u. MAGUIRE (1971), MANDELS et al. (1962) und MANDELS und REESE (1960) als optimal für die Induktion von cellulolytischen Enzymen in *Trichoderma reesei* gilt, wobei jedoch das Wachstum stark reduziert wird. Das Minimalmedium wurde ohne Proteose Peptone eingesetzt, um unkontrollierbare Enzyminduktionen durch Bestandteile dieses Zusatzes zu vermeiden. Die Konzentration gewaschener Myzelien wurde immer auf ca. 2 mg Trockengewicht pro ml ($\pm$ 0,2 mg/ml) eingestellt, da bei *Sporotrichum pulverulentum* in diesem Bereich die lag-Phase bis zum ersten Auftreten der Enzyme im Medium (oberhalb der Nachweisgrenze) nicht mehr von der Konzentration des Myzels abhängt (ERIKSSON und HAMP, 1978). Nach einigen Versuchen mit geringeren Myzelkonzentrationen trifft diese Abhängigkeit auch bei *Trichoderma reesei* zu. Außerdem hängt auch die maximale Enzymkonzentration von der Konzentration des Produzenten ab.

c) Kontinuierliche Kulturen

Für die kontinuierlichen Kulturen auf Glucose, Cellobiose und Lactose wurde ein 5 l-Biostat V-Fermenter der Firma Braun Melsungen mit einem Arbeitsvolumen von 3 l verwendet. Die Durchmischung bei einer Rührergeschwindigkeit von 500 Upm wurde durch den Einsatz eines Mantel-Wärmetauschers mit Schikanen nach dem Umwurfverfahren unterstützt. Die Betriebstemperatur betrug 27 °C; die Begasung erfolgte mit 1 l Luft pro l Kulturflüssigkeit und Minute (= 1v/vm). Der pH-Wert wurde mit 3 N Phosphorsäure und 3 N Natronlauge auf pH 5,0 geregelt. Das Medium wurde mit einer Schlauchpumpe (Gilson Minipuls II) über eine Thermofalle in den Fermenter gepumpt. Die Volumenregelung erfolgte durch einen elektronischen Kontakt in einem Nebenschluß des Fermentergefäßes, durch den eine Verder-Schlauchpumpe in Betrieb gesetzt wurde. Eine Thermofalle am Auslauf verhinderte eine Infektion auf diesem Wege. Die Schaumbildung wurde vermieden, indem statt Tween 80 0,05 % (w/v) Polypropylenglycol in das Medium gegeben wurde.

Die Fermentation mit Cellobionsäure erfolgte aus Materialkostengründen in einem 200 ml Glasgefäß mit einem Doppelmantel zur Temperierung. Das Arbeitsvolumen betrug 100 ml; es wurde durch die Verwendung einer Gilson Miniplus II-Schlauchpumpe mit einem vierfachen Pumpenkopf konstant gehalten, indem ein Schlauch mit kleinem Durchmesser das Medium zuführte, während über einen Schlauch mit großem Durchmesser Kulturflüssigkeit abgezogen wurde. Die Öffnung des Überlaufes wurde auf die Höhe des Flüssigkeitsspiegels eingestellt, während die der Luftzuführung (1 v/vm) in Bodennähe lag. Die Durchmischung erfolgte mit Hilfe eines dreikantigen, 4 cm langen Magnetstäbchens mit Teflonbeschichtung und eines Magnetrührers (Ika-Kombimag) mit 400 Upm. Die Temperierung erfolgte über einen mgw-Lauda-Thermostaten auf 27 °C. Der pH der Kulturflüssigkeit wurde auf etwa 5,0 gehalten, indem der pH des zugeführten Mediums je nach Durchflußrate variiert wurde.

5. Herstellung gewaschener Myzelien

Für die Anzucht des Pilzes wurde hier 1 % Glycerin als Kohlenstoffquelle in 500 ml-Kulturen benutzt, weil durch Glycerin keine cellulolytischen Enzyme induziert werden (MANDELS und REESE, 1960; VAHERI et al. 1979). Das Myzel wurde bei ca. 17000 x g und 5 °C abzentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen mit Minimalmedium ohne Proteose Peptone mit pH 3 wurde die Myzelmasse in diesem Medium suspendiert. Alle Arbeitsvorgänge wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

6. Herstellung von zellfreien Enzymlösungen

Kulturfiltrat
Die Myzelien wurden 15 min bei ca. 9000 x g oder 17000 x g bei 5 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch Glasfaserfilter (Whatman GF/C) filtriert und als Kulturfiltrat eingesetzt.

Rohextrakt
Rohextrakte wurden aus abzentrifugierten, dreimal mit Saline gewaschenen Myzelien gewonnen. Diese wurden bei -20°C in einer X-Presse (AB Biox, Nacka, Schweden) eingefroren und mittels einer hydraulischen Presse mit ca. 1000 $kg/cm^2$ dreimal durch eine Öffnung von 0,8 mm Durchmesser gepreßt. Die Zelltrümmer und nicht aufgebrochenen Hyphenreste wurden 20 min bei 48000 x g abzentrifugiert. Der Überstand diente als zellfreier Extrakt zu weiteren Untersuchungen.

7. Proteinbestimmungen

a) Biuret-Methode
Für Kulturfiltrate aus Schüttelkulturen, die Tween 80 enthielten, wurde eine Proteinbestimmung nach GORNALL et al. (1946) durchgeführt. Das Reagenz bestand aus:

9 g K-Na-Tartrat
3 g $CuSO_4$ x 5 $H_2O$
5 g KJ
0,2 N NaOH ad 1000 ml

Mit 3 M Trichloressigsäure wurde das Protein in 1,0 ml Probe präzipitiert. Nach Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 0,2 ml $H_2O$ aufgenommen und mit 1 ml Biuret-Reagenz versetzt. Nach 30 min wurde die Extinktion bei 546 nm gegen eine Kontrolle ohne Protein gemessen. Zur Erstellung einer Eichkurve diente Rinderserumalbumin.

b) Bestimmung nach Bradford
Dieser Test wurde bei Proben benutzt, die kein Detergenz (Tween 80) enthielten wie die Kulturfiltrate aus den kontinuierlichen Kulturen. Hierzu wurde 0,1 ml Probe mit 1 ml der folgenden Lösung versetzt:

100 mg Coomassie Blue in 50 ml 95 % Ethanol
100 ml 85 % Phosphorsäure ($H_3PO_4$)
mit $H_2O$ ad 1000 ml.

Nach 15 min bei Raumtemperatur erfolgte die Extinktionsmessung bei 595 nm. Eine Eichkurve wurde mit Rinderserumalbumin erstellt.

c) Bestimmung nach LOWRY et al. (1951)
Diese Methode wurde bei Rohextrakten und angereicherten Proteinen herangezogen. Das Reagenz bestand aus folgenden Lösungen:

Lösung A: 40 g $Na_2CO_3$ in 500 ml 0,1 N NaOH
Lösung B: 0,5 g $CuSO_4$ x 5 $H_2O$ und
1 g K-Na-Tartrat in 100 ml 0,1 N NaOH
Aus 50 Teilen Lösung A und 1 Teil Lösung B wurde täglich das Reagenz neu gemischt.

Zu 0,2 ml Probe wurde 1 ml Reagenz und nach 10 min bei Raumtemperatur 0,1 ml Folin-Ciocalteu-Lösung ( 50 % v/v) gegeben. Nach 30 min wurde die Extinktion bei 660 nm gemessen. Die Eichkurve wurde mit Rinderserumalbumin erstellt.

d) Proteinbestimmung in ganzen Zellen

Zur Proteinbestimmung in ganzen Zellen wurde die LOWRY-Methode modifiziert nach HERBERT et al. (1971) benutzt. Da die Proteinkonzentration als indirektes Maß für die Myzelkonzentration dienen sollte, wurde eine Eichkurve (Abb. 5) mit gewaschenem Myzel angefertigt und eine Beziehung zwischen dem Trockengewicht und der Extinktion des Proteinbestimmungsansatzes bei 750 nm erstellt. Hierzu wurde in einer Verdünnungsreihe von gewaschenem Myzel das Trockengewicht bestimmt, indem definierte Volumina auf Papierfilter (Ø = 2 cm) abgezogen wurden, die vorher bei 110 °C getrocknet und gewogen worden waren. Anschließend wurden sie erneut getrocknet und dann die Gewichtsdifferenz als mg Trockengewicht pro ml bestimmt. Von den jeweiligen Verdünnungen wurden 0,5 ml zur Proteinbestimmung mit 0,5 ml 1 N NaOH 5 min lang ge-

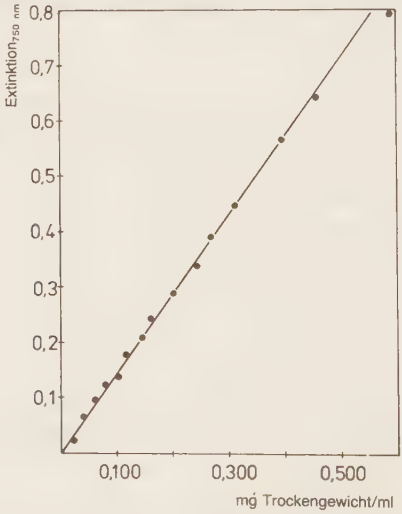



Abb. 5: Standardkurve zur Proteinbestimmung ganzer Myzelien nach HERBERT et al. (1972)

kocht und dann im Eisbad abgekühlt. Diesem Ansatz wurden 2,5 ml einer frisch angesetzten Mischung aus 5 % $Na_2CO_3$ in $H_2O$ und 0,5 % $CuSO_4$ in 1 % K-Na-Tartrat und nach 10 min bei Raumtemperatur 0,5 ml Folin-Ciocalteu Lösung (50 % v/v) zugesetzt. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 750 nm bestimmt.

Da in den Proben aus den Kulturen auch das Protein im Kulturfiltrat mit dieser Methode erfaßt wird, müssen die Werte für die Biomasse um die Proteinkonzentration im Filtrat korrigiert werden.

8. Bestimmung von Zuckern und Zuckerderivaten

a) Reduzierende Zucker nach der Methode von NELSON (1944) und SOMOGYI (1952)

Dieser Test diente zum quantitativen Nachweis aller reduzierenden Zucker: Glucose, Cellobiose, Thiocellobiose, Lactose und Sophorose.

Reaktionslösungen:

Lösung A: 25 g $Na_2CO_3$ wasserfrei
25 g K-Na-Tartrat
20 g $NaHCO_3$
200 g $Na_2SO_4$ wasserfrei
ad 1000 ml Aqua dest.

Lösung B: 15 g $CuSO_4 \times 5\ H_2O$
ad 100 ml Aqua dest.
Zwecks besserer Löslichkeit werden 2 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure zugefügt.

Lösung C: 25 g Ammoniummolybdat
ad 450 ml Aqua dest.
21 ml konzentrierte Schwefelsäure
3 g $Na_2HAsO_4 \times 7\ H_2O$
ad 25 ml Aqua dest.

Dieser Ansatz (496 ml) wird in einer dunklen geschlossenen Flasche 48 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Vor Beginn der Analyse wird ein Reaktionsgemisch AB aus 25 Vol. Lösung A und 1 Vol. Lösung B frisch hergestellt.

Ansätze aus 0,5 ml Probe und 0,5 ml Reaktionsgemisch AB wurden 20 min im kochendem Wasserbad erhitzt. Nach 10-minütiger Abkühlung im Eisbad wurden 0,5 ml Lösung C zugegeben und nach 15 min mit Aqua dest auf 12,5 ml aufgefüllt. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 520 nm (Abb. 6).

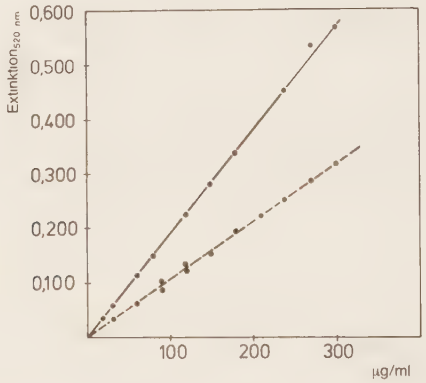



Abb. 6: Standardkurven zur Bestimmung reduzierender Zucker nach NELSON (1944) und SOMOGYI (1952): (——) Glucose, (- - -) Lactose und Cellobiose.

b) Zuckerbestimmung mittels Anthron-Reagenz
Mit dieser Methode nach HERBERT et al. (1971) wurden derivatisierte Zucker (Isopropyl-thioglucopyranosid, Methyl-ß-D-glucopyranosid, Cellobionsäure) und Cellulose nachgewiesen.

Anthron-Reagenz:
200 mg Anthron werden in 5 ml Ethanol gelöst und mit 75 %-iger Schwefelsäure auf 100 ml aufgefüllt. Das Reagenz muß täglich frisch zubereitet und ständig gekühlt werden.

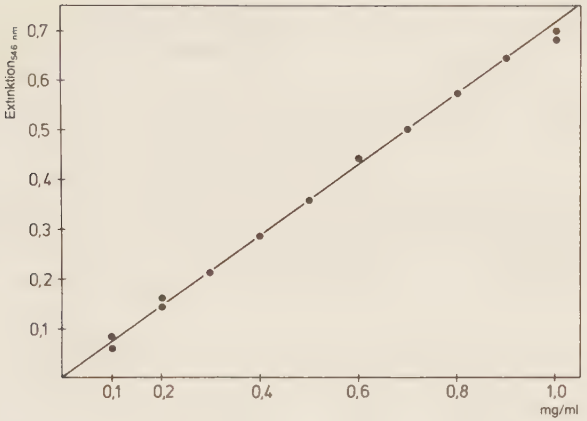



Abb. 8: Standardkuve zur Lactonbestimmung mit Hydroxylamin nach HESTRIN (1949) und MOELLER (1972)

Lösungen:

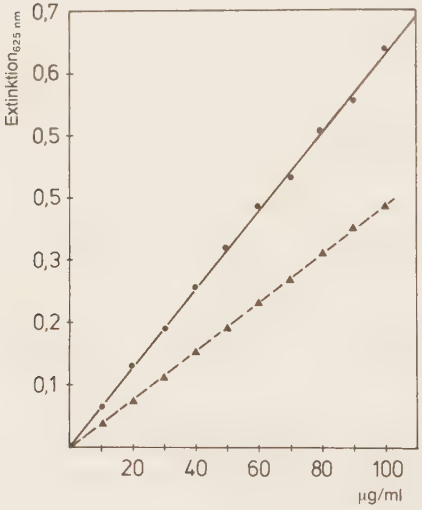
A: Hydroxylamin-Hydrochlorid: 138 mg/ml Aqua dest.
B: Natriumhydroxid: 140 mg/ml Aqua dest.
C: Salzsäure: 4 M
D: Eisen-III-chlorid x 6 $H_2O$: 100 mg/ml 0,1 N Salzsäure

Zu 1 ml Probe wurden 2 ml einer frisch hergestellten Mischung aus A und B pipettiert, gemischt und anschließend mit je 1 ml der Lösungen C und D erneut durchmischt. Anschließend wurde sofort die Extinktion dieses Ansatzes bei 546 nm bestimmt.

d) Enzymatische Glucosebestimmung

Zum spezifischen Nachweis von Glucose wurde ein käufliches Enzymsystem der Firma Merck (BANAUCH et al., 1975; TEUSCHER und RICHTERICH, 1971) benutzt. Hierbei wird ß-D-Glucose in Gegenwart von NAD durch Glucose-Dehydrogenase (Gluc-DH) zu D-Gluconolacton und NADH + $H^+$ umgesetzt. Zusatz von Mutarotase beschleunigt den Reaktionsverlauf. Die Menge des gebildeten NADH ist der Glucose-Konzentration proportional.

Der Bestimmungsansatz aus 1 ml Probe und 5 ml Reagenz wurde im Eisbad zusammengebracht, gut durchmischt, ca. 5 min gekühlt und dann 10 min lang gekocht. Nach der Abkühlung im Eis wurde die Extinktion bei 625 nm gegen einen Blindwert mit Wasser gemessen. Bei der Bestimmung der Cellulose-Konzentration wurde nicht das Kulturfiltrat sondern Kulturflüssigkeit in den Test eingesetzt, so daß gleichzeitig die zelleigenen Kohlenhydrate des Myzels erfaßt wurden. Nachdem eine Anthron-Eichkurve mit gewaschenen Myzelien erstellt worden war, wurden die Meßwerte für Cellulose um die Zucker der Biomasse korrigiert (Abb. 7).



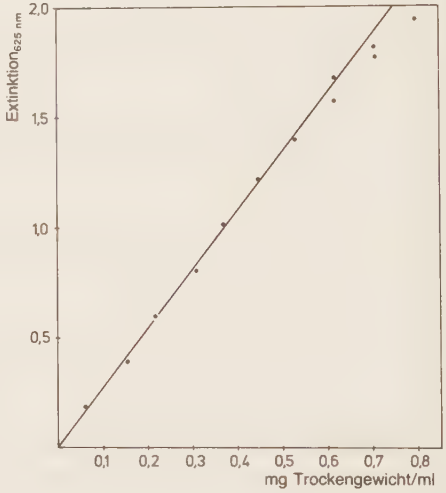




Abb. 7a

Abb. 7b

Abb. 7a: Standardkurven zur Bestimmung von Zuckern mit dem Anthron-Reagenz nach HERBERT et al. (1972): (●——●) Glucose, Isopropyl-thioglucosid, (▲- - -▲) Methyl-ß-D-glucosid

Abb. 7b: Standardkurve zur Bestimmung von Zuckern in ganzen Zellen nach HERBERT et al. (1972)

c) Lactonbestimmung mit Hydroxylamin

Im Verfahren nach HESTRIN (1949) und MOELLER (1972) werden Lactone zu einem Hydroxamsäure-Eisen(III)-Komplex umgesetzt, der durch Messung der Absorption bei 546 nm quantitativ erfaßbar ist (Abb. 8).

Reaktionslösung:

| | | |
|---|---|---|
| 0,12 | M | Phosphatpuffer pH 7,6 |
| 0,15 | M | Natriumchlorid |
| 1,1 | mM | NAD |
| 5,2 | U/ml | Gluc-DH |
| 0,11 | U/ml | Mutarotase |

Der Testansatz aus 0,2 ml Probe und 2 ml Reaktionslösung wurde nach 20 min bei Raumtemperatur gegen einen Blindwert bei 340 nm gemessen.

e) Enzymatische Bestimmung von Gluconsäure

Es wurde ein Enzymsystem der Firma Boehringer nach MÖLLERING und BERGMEYER (1967) benutzt. D-Gluconsäure und ATP werden in Gegenwart von Gluconat-Kinase zu Gluconsäure-6-phosphat und ADP umgesetzt. Gluconsäure-6-Phosphat wird durch NADP mittels 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase zu Ribulose-5-Phosphat oxidiert, wobei $CO_2$ und NADPH + $H^+$ entstehen. Die gebildete NADPH-Menge ist der Gluconsäure-Konzentration äquivalent.

Reaktionslösungen:

A: 2,2 mg/ml NADP und 5,5 mg ATP in 0,1 M Triethanolamin-Puffer bei pH 7,8

B: 220 U/ml 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase

C: 26 U/ml Gluconat-Kinase

Ein geeignetes Probenvolumen wurde mit $H_2O$ auf 2 ml gebracht und mit 1 ml A und 0,02 ml B vermischt. Nach ca. 5 min wurde die Extinktion bei 340 nm gemessen und die Reaktion durch Zugabe von 0,02 der Lösung C gestartet. Nach Stillstand der Reaktion (ca. 15 min) wurde die Extinktion erneut gemessen und $\Delta E$ bestimmt. Die Gluconsäure-Konzentration wurde nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet:

$$c = \frac{V \times MG}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E \qquad (g/l)$$

V = Testvolumen (ml)
v = Probenvolumen (ml)
MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz
d = Schichtdicke (cm)
$\varepsilon$ = Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm, 6,3 (1 x $mmol^{-1}$ x $cm^{-1}$)

f) Zuckernachweis durch einen Zuckeranalysator

Im Zuckeranalysator (Biotronik ZA5100) werden Zucker nach VOELTER (1974) und VOELTER et al. (1974) an einem stark basischen Ionenaustauscher getrennt und mit einem Orcin-Schwefelsäure-Reagenz zu einem Farbstoff umgesetzt, dessen Konzentration photometrisch gemessen wird. Die Abb. 9a zeigt den schematischen Aufbau des Analysators.

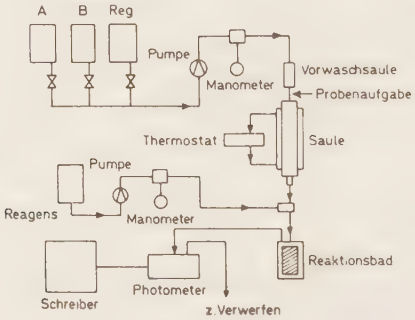



Abb. 9a: Blockschema des automatischen Zuckeranalysators

Die Zucker wurden unter folgenden Bedingungen analysiert:

Vorwaschsäule: Harz = Aminex AG 1 x 4, Länge 7cm, Ø = 6 mm
Trennsäule: Harz = Aminex DA-X4-20, Länge 28cm, Ø = 6 mm
Farbreagenz: 1,1 g Orcin pro 1 l konz. Schwefelsäure
Puffer A: 0,4 M $H_3BO_3$ mit KOH auf pH 9,4 - 9,5 eingestellt, zur Äquilibrierung der Säulen, Laufzeit 0,7 h
Puffer B: 1,0 M $H_3BO_3$ mit KOH auf pH 9,4 - 9,5 eingestellt zur Elution, Laufzeit 1,9 h

Puffer Reg: 10 % $K_2B_4O_7$ zur Regeneration der Säulen, Laufzeit 0,5 h
Säulentemperatur: 60 °C
Pufferdurchfluß: 60 ml/h
Reagenzdurchfluß: 70 ml/h
Extinktionsbereich: $E_{max}$= 0,2

Die Eichkurve für Cellobionsäure (Abb. 9b) zeigt, daß das Integral der Absorptionskurve (Area) oberhalb einem Wert von 50000 nicht mehr proportional zur aufgetragenen Zuckermenge anstieg. Daher wurden Proben vor der Analyse geeignet verdünnt.

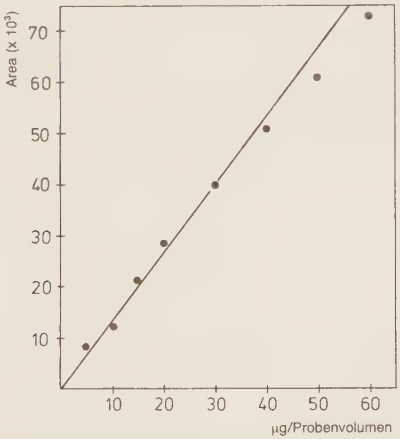



Abb. 9b: Standardkurve zur Bestimmung von Cellobionsäure mit dem Zuckeranalysator

g) Analyse von Zuckerderivaten durch Isotachophorese
Die Isotachophorese ist ein elektrophoretisches Verfahren, in dem die Probenbestandteile nach ihrer unterschiedlichen Nettomobilität getrennt werden (MOBERG et al., 1977; EVERAERTS et al., 1976). Die Trennung findet in einem diskontinuierlichen Puffersystem statt, das eine Komponente mit sehr hoher Nettomobilität - den leitenden Elektrolyten - und eine mit sehr niedriger Nettomobilität - den Nachfolgeelektrolyten - enthält. Im elektrischen Feld ordnen sich die Probenbestandteile zwischen diesen Komponen-

ten in der Reihenfolge ihrer Nettomobilität an und wandern dann alle mit gleicher Geschwindigkeit in Zonen mit unmittelbarem Kontakt. Beim analytischen Verfahren findet die Trennung in einer Kapillare statt, an die ein oder mehrere Detektionssysteme angeschlossen sind.

Es wurde das LKB 2127 Tachophor bestehend aus Energieeinheit (0 - 500 $\mu$A, bis 30000 V) und Trenneinheit mit Kapillarsystem (20 cm Länge), Leitfähigkeits- und UV-Detektor bei einer konstanten Stromstärke von 50 $\mu$A benutzt. Auf einem Laumann 3-Kanal-Schreiber wurden UV-Absorption, Leitfähigkeit und die Ableitung der Leitfähigkeit aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte anhand der Ableitungsmaxima, so daß die Standardkurve für Gluconsäure nicht durch den Ursprung des Koordinatensystems führt, weil diese Maxima zwischen zwei Zonen mit konstanter Leitfähigkeit liegen (Abb. 10).

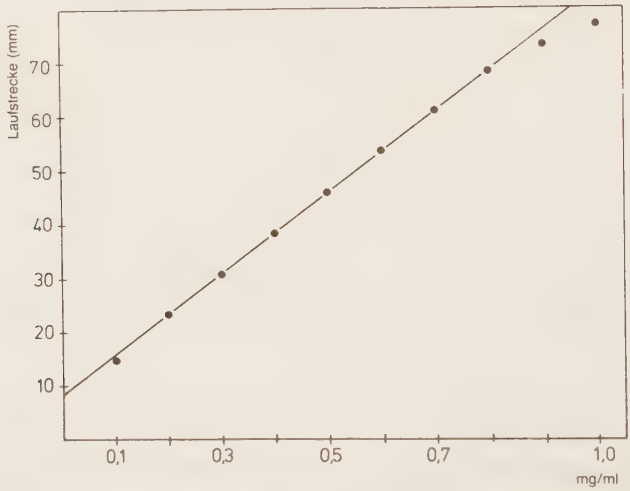



Abb. 10: Standardkurve zum Nachweis von Gluconsäure durch Isotachophorese.

Es wurden folgende Elektrolytsysteme verwendet:

Leitelektrolyt:
- 103 mg Diglycin
- 200 mg Triton X
- 700 ul 1 M HCl
- 30 ml Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)
- ad 1000 ml Aqua dest.

HPMC ist nicht geladen und verringert infolge seiner hohen Viskosität die Diffusion.

Nachfolgeelektrolyt: 5 mM Hexansäure (Capronsäure) in $H_2O$

Die Trennung erfolgte bei Raumtemperatur.

h) Dünnschichtchromatographie zur qualitativen Zuckeranalyse
Die Chromatographien wurden auf Kieselgel-Fertigplatten MN Sil G-25 (0,25 mm) der Firma Macherey und Nagel, Düren nach der Methode von GÜBITZ et al. (1976) durchgeführt.

Laufmittel:
- 7 Teile Isopropanol
- 4 Teile Ethylacetat
- 5 Teile $H_2O$
- 5 Teile konzentrierte Ammoniak-Lösung

Sprühreagenz: Lösung A: 2 % (w/v) Bleitetraacetat in Eisessig
Lösung B: 1 % (w/v) 2,7-Dichlorfluorescein in absoluten Ethanol
Je 1 ml von A und B wurden in 40 ml Benzol aufgenommen. Diese Lösung bleibt ca. 2 h stabil.

Bei der Färbung führt Bleitetraacetat an Zuckern eine Diolspaltung durch und wird dadurch verbraucht. Das nicht verbrauchte Bleitetraacetat überführt Fluorescein in ein nicht fluorescentes Oxidationsprodukt. Die Zuckerflecken treten somit durch eine stärkere Fluorescenz hervor. Nach diesem Verfahren wurde die Konzentration von Glycerin anhand der Intensität der Flecken beurteilt, nachdem mehrere Chromatographien mit jeweils mehreren Glycerin-Konzentrationen zur Eichung durchgeführt worden waren.

## 9. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Aktivität der folgenden Enzyme wurde bei 50 °C bestimmt. Eine Enzymeinheit (U) entspricht einem µmol umgesetzten Substrats pro Minute (internationale Einheit = IU) unter den angegebenen Bedingungen. Abweichend hiervon wurden bei der CMCase µmol gebildetes Produkt gemessen. Die Aktivitäten wurden als U pro ml Enzymlösung, spezifische Aktivitäten als U pro mg Protein angegeben.

a) Cellulase = ß-1,4-Glucano-Glucan-Hydrolase (CMCase) (E.C. 3.2.1.4)
Die Cellulaseaktivitäten wurden nach MANDELS und WEBER (1969) mit Carboxymethylcellulose (CMC, 1 % (w/v) in 0,05 M Acetatpuffer, pH 5) gemessen.

Reaktionsansatz:
0,5 ml CMC-Lösung
0,5 ml Enzym

Nach 30 min Inkubation wurde die Reaktion durch 5 min Kochen beendet. Die durch den enzymatischen Abbau aus dem Substrat freigesetzten reduzierenden Zucker wurden nach der Methode von NELSON und SOMOGYI (1944, 1952) bestimmt. Vor der photometrischen Messung wurde das restliche CMC bei ca. 9000 x g abzentrifugiert. Die Angabe der Enzymeinheiten erfolgte als µmol Glucoseäquivalente freigesetzter reduzierender Zucker pro Minute.

b) ß-Glucosidase (= Aryl-ß-glucosidase) (E.C. 3.2.1.21)
Wie von WOOD (1971) und MAGUIRE (1977) beschrieben, wird das synthetische Substrat p-Nitrophenyl-ß-D-Glucopyranosid (p-NPG) durch die ß-Glucosidase in Glucose und p-Nitrophenol gespalten. p-Nitrophenol ist im basischen Milieu gelb gefärbt. Die Farbintensität wird bei 405 nm gemessen und ist das Maß der Enzymaktivität. Mit diesem Verfahren wurde die Konzentration von ß-Glucosidasen bei Induktions- und Wachstumsversuchen bestimmt.

Reaktionsansatz (1 ml):

0,01 M p-NPG
0,05 M Acetatpuffer, pH 5
Enzym

Die Inkubation wurde nach 30 min durch Alkalisierung mit 2 ml einer 1 M $Na_2CO_3$-Lösung gestoppt. Nach Verdünnung mit 10 ml $H_2O$ wurde die Extinktion bei 405 nm gemessen. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde p-Nitrophenol im gleichen Ansatz ohne Enzym benutzt (Abb. 11).

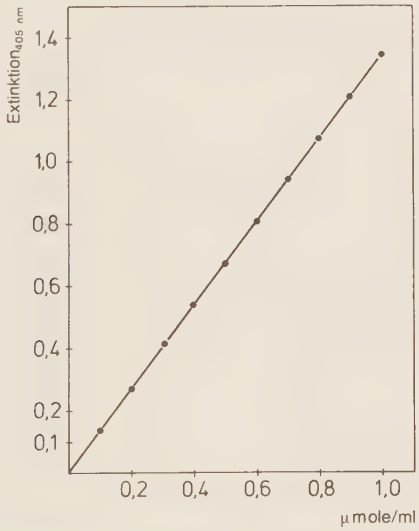



Abb. 11: Standardkurve von p-Nitrophenol zur Bestimmung der ß-Glucosidase-Aktivität mit p-NPG

c) ß-Glucosidase (= Cellobiase) (E.C. 3.2.1.21)

Das natürliche Substrat für die ß-Glucosidase ist die Cellobiose, die durch das Enzym zur Glucose hydrolysiert wird. Diese Reaktion wurde nach SELBY und MAITLAND (1971) bestimmt. Durch diese Methode wurde die Aktivität von ß-Glucosidasen bei der Differenzierung von Cellobiase und Cellobionsäurehydrolase bestimmt.

Reaktionsansatz (1,5 ml):

3 mM Cellobiose
20 mM Acetatpuffer, pH 5,0
Enzym

Die Reaktion wurde nach 30 min durch 5 minütiges Kochen beendet. Die freigesetzte Glucose wurde enzymatisch (siehe 8d) bestimmt.

Die Hydrolyse von Cellobionsäure durch ß-Glucosidasen wurde im gleichen Verfahren bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch die enzymatische Erfassung beider Produkte und isotachophoretischen Nachweis der Gluconsäure.

d) Lactonase

Bei diesem diskontinuierlichen Test wird nach HESTRIN (1949) nicht hydrolysiertes Lacton in einem Bestimmungsansatz gemessen.

Reaktionsansatz (1 ml):

0,033 M Acetatpuffer, pH 4 bzw. pH 5 (0,75 ml) bei pH 7 durch Phosphatpuffer zu ersetzen
0,028 M Enzymsubstrat (0,2 ml einer Lösung von 25 mg/ml an D-Galactono-1,4-Lacton bzw. D-Glucono-1,5-Lacton oder 50 mg/ml Cellobionolacton im obigen Puffer)
0,05 ml Enzym

Das Gemisch aus Puffer und Enzym wurde 5 min bei 50 °C vortemperiert, bevor die Hydrolyse-Reaktion mit frisch hergestellter Substratlösung gestartet wurde. Da Cellobionolacton nicht käuflich war, wurde Cellobionsäure in wässriger Lösung auf pH 4 eingestellt und zur Einstellung eines Gleichgewichts zwischen Cellobionsäure und Cellobionolacton über Nacht im Kühlschrank gelagert. Unmittelbar nach dem Start und nach 5, 10, 15, 20 und 30 min wurden 0,1 ml aus dem Testansatz entnommen und zur Lactonbestimmung (siehe 8c) eingesetzt. Bei der Berechnung der Lactonase-Aktivität wurde die Spontanhydrolyse, die in einem Ansatz ohne Enzym ermittelt wurde, berücksichtigt.

10. Anreicherung und Differenzierung der Cellobionsäurehydrolase

a) Proteinaussalzung mit Ammoniumsulfat
Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden alle Fällungen bei 0 °C durchgeführt und zur Gleichgewichtseinstellung mindestens 2 Stunden gerührt. Ammoniumsulfatkonzentrationen wurden nach der folgenden Formel (JAENICKE, 1966; DIXON, 1953; DI JESU, 1958) berechnet:

$$\text{Gramm } (NH_4)_2SO_4 = \frac{1{,}77 \times V \times (S - s)}{3{,}54 - S}$$

V = Volumen der Lösung in ml
S bzw. s = gewünschte bzw. vorliegende Ammoniumsulfatsättigung bei 0 °C in Bruchteilen von 1

Das Präzipitat wurde bei 48000 x g abzentrifugiert und in einem der Weiterverwendung entsprechendem Puffer aufgenommen. Da nur Rohextrakte mit sehr geringem Anteil von Cellulasen auf diesem Weg verarbeitet wurden, konnten die aufgenommenen Pellets über Nacht in Visking-Dialyseschläuchen mit 7 mm Durchmesser und 0,05 mm Wandstärke (Serva, Heidelberg) bei 4 °C gegen den entsprechenden Puffer dialysiert werden.

b) Gelfiltration an Sephacryl S-300
Sephacryl S-300 superfine (Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurde in einer 2,5 x 91 cm Säule mit 10 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,0 äquilibriert. Der Puffer enthielt 0,1 M Natriumchlorid zur Erhöhung der Ionenstärke, um Wechselwirkungen zwischen der Gelmatrix und Bestandteilen der Proteinprobe auszuschalten. Mit dem gleichen Puffersystem wurden die Proteine bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 10,3 ml in Fraktionen von 5,15 ml eluiert. Die Verteilung der Proteine wurde bei 280 nm im LKB-Uvicord S verfolgt. Sämtliche Arbeitsvorgänge wurden bei 4 °C durchgeführt.

c) Polyacrylamidgel-Elektrophorese
Die Elektrophoresen wurden bei 4 °C mit 0,5 x 10 cm Rundgelen in einer Apparatur für 12 Gele von Bio-Rad (Modell 150A) durch-

geführt. Es wurde eine konstante Stromstärke von 1,5 mA pro Rundgel bei einer maximalen Spannung von 300 V angelegt, bis die Proben das Sammelgel durchwandert und das Trenngel erreicht hatten. Dann wurde die Stromstärke auf 4 mA pro Gel erhöht. Es wurden folgende Gelsysteme benutzt:

Saures Gelsystem (Nr. 7 nach MAURER, 1971) mit 7,0 % (w/v) Acrylamidgehalt bei pH 4,3:

Sammelgel:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1 Teil | 1 N KOH | 48,0 | ml | |
| | Essigsäure | 2,87 | ml | pH 6,7 |
| | TEMED | 0,46 | ml | |
| | Aqua dest. | ad 100 | ml | |
| 2 Teile | Acrylamid | 10,0 | g | |
| | Bisacrylamid | 2,5 | g | |
| | Aqua dest. | ad 100 | ml | |
| 1 Teil | Riboflavin | 4,0 | mg | |
| | Aqua dest. | ad 100 | ml | |
| 4 Teile | Saccharose | 40 | g | |
| | Aqua dest. | ad 100 | ml | |

Vor der Polymerisation durch Lichteinwirkung ist die Mischung gut zu entlüften.

Trenngel:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1 Teil | 1 N KOH | 48,0 | ml | |
| | Essigsäure | 17,2 | ml | |
| | TEMED | 4,0 | ml | pH 4,3 |
| | Aqua dest. | ad 100 | ml | |
| 2 Teile | Acrylamid | 28,0 | g | |
| | Bisacrylamid | 0,735 | g | |
| | Aqua dest. | ad 100 | ml | |
| 1 Teil | Aqua dest. | | | |

4 Teile 0,3 % (w/v) Ammoniumpersulfat in Aqua dest.
(muß für jeden Ansatz frisch hergestellt werden)
Vor der Zugabe von Ammoniumpersulfat muß der Ansatz gut entlüftet werden.

Elektrodenpuffer:

| | | | |
|---|---|---|---|
| ß-Alanin | 3,12 | g | |
| Essigsäure | 0,8 | ml | pH 4,5 |
| Aqua dest. ad | 100 | ml | |

Probenpuffer:

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1 N KOH | 48,0 | ml | |
| Essigsäure | 17,2 | ml | pH 4,3 |
| Aqua dest. ad | 100 | ml | |

Auf 19 Teile Probe werden ein Teil Puffer und 5 µl einer Cytochrom C-Lösung (1 mg/ml) gegeben.

Alkalisches Gelsystem nach FURLONG (1973) mit 7,6 % (w/v) Acrylamidgehalt bei pH 8,8:

Sammelgel:

6 ml:
Acrylamid 0,499 g
Bisacrylamid 0,125 g
Aqua dest. ad 10 ml

3 ml:
0,128 M $H_3PO_4$
0,238 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)
Aqua dest. pH 7,2

3 ml:
0,05 % (w/v) Ammoniumpersulfat
0,002 % (w/v) Riboflavin
Aqua dest.

6 ul:
TEMED nach Entlüften der obigen Mischung

Trenngel:

10 ml:
Acrylamid 15,2 g
Bisacrylamid 0,8 g
Aqua dest. ad 100 ml

5 ml: 1,5 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,8

5 ml: 0,3 % (w/v) Ammoniumpersulfat in Aqua dest.

40 ul: TEMED nach Entlüften der obigen Mischung

Kathodenpuffer (oben):
0,052 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
0,055 M Glycin
0,001 M Thioglycolsäure
Aqua dest. pH 8,8

Anodenpuffer (unten):
0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,1

Probenpuffer:
0,26 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
0,275 M Glycin
0,005 M Thioglycolsäure
Aqua dest. pH 8,8

Auf 19 Teile Probe wird ein Teil Puffer gegeben. Zu 500 $\mu$l gibt man je einen Tropfen Glycerin und einen Tropfen einer 0,001 % (w/v) Bromphenolblau-Lösung.

In beiden Gelsystemen wurde die Gelstärke ggf. durch geeignetes Verdünnen der Acrylamid-Bisacrylamid-Komponente im Trenngel auf 5 % (w/v) verringert. Die Proteinkonzentration der Proben wurde bei Bedarf durch Einengen über Diaflo PM10 Ultrafiltrationsmembranen (Amicon, Witten) verbessert.

Proteinfärbung
Die Gele wurden nach der Methode von FAIRBANKS et al. (1971) gefärbt. Zunächst ließ man eine Lösung von 25 % Isopropylalkohol, 10 % Essigsäure und 0,025 - 0,05 % Coomassie-Blau (R-250) in Aqua dest. über Nacht, mindestens jedoch 6 - 8 Stunden auf das Gel einwirken. Die Entfärbung wurde mit 10 % Isopropanol, 10 % Essigsäure und 0,0025 - 0,005 % Coomassie-Blau in Aqua dest.

eingeleitet. Nach 6 - 9 Stunden wurde diese Lösung gegen 10 % Essigsäure ausgetauscht, die bis zur völligen Transparenz der nicht gefärbten Gelbereiche evtl. mehrmals erneuert wurde.

Lokalisation der ß-Glucosidasen im Gel
Ungefärbte Gele wurden im Querschnitt in ca. 1,7 mm starke Scheibchen geschnitten. Diese wurden halbiert und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 0,1 ml 0,2 M Acetatpuffer, pH 4,0 und 0,15 ml Cellobiose bzw. Cellobionsäure (je 10 mg pro ml Puffer) bei 30 °C inkubiert. Je 0,1 ml des Überstandes wurden in die Aktivitätstests eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte durch Nachweis der freigesetzten Glucose, wurde aber wegen der ungenauen Fraktionierung der Gele lediglich als Extinktion im Bestimmungsansatz den Gelscheiben zugeordnet. Gelfraktionen mit ß-Glucosidase-Aktivität heben sich vom Niveau der nicht aktiven Fraktionen hervor.

d) Vergleich der reaktionskinetischen Parameter der ß-Glucosidase gegen Cellobiose und Cellobionsäure
Bei verschiedenen Substratkonzentrationen wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit für die verschiedenen Substrate allein und in Anwesenheit von Inhibitoren bestimmt. Die $K_M$- und $V_{max}$-Werte wurden aus dem Lineweaver-Burk Diagramm (LINEWEAVER und BURK, 1934) graphisch ermittelt. Der $K_M$-Wert wurde zusätzlich nach der Formel:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M + S}{V_{max} \times S}$$

berechnet. Die Auswertung von Inhibitionskinetiken erfolgte im Dixon Diagramm (DIXON, 1953).

III. ERGEBNISSE

1. Wachstum und Enzymbildung auf Glucose und Glycerin

Glucose und Glycerin gelten in der Literatur als gute Substrate für *Trichoderma reesei*, die zwar gutes Wachstum gewährleisten, aber keine cellulolytischen Enzyme induzieren (MANDELS und REESE, 1959, 1960; MANDELS et al., 1962; SHIN et al., 1978; VAHERI et al., 1979). Eine der beiden Substanzen sollte bei Induktionsversuchen in Kontrollen ohne Enzymbildung und als Zusatzsubstrat eingesetzt werden, wenn eine Testsubstanz nicht metabolisiert werden konnte. Daher wurde das Wachstum auf beiden Substraten unter gleichen Bedingungen verglichen.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Verlauf aller gemessenen Daten zwischen beiden Substanzen festgestellt werden (Abb. 12, 13). In beiden Fällen war das Substrat nach spätestens 48 Stunden verbraucht und das Maximum an Biomasse erreicht. Weder auf Glucose noch auf Glycerin konnten Cellulasen (CMCasen) nachgewiesen werden. ß-Glucosidasen traten erst im Kulturfiltrat auf, nachdem das Wachstum abgeschlossen war und an der Abnahme

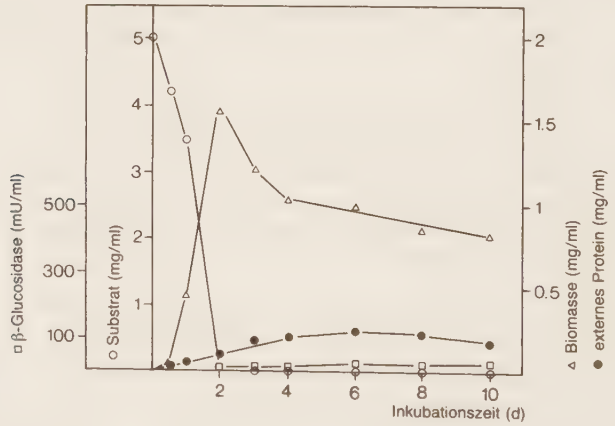



Abb. 12: Wachstum und Synthese extrazellulärer Enzyme auf 0,5 % Glucose; CMCase war nicht nachweisbar

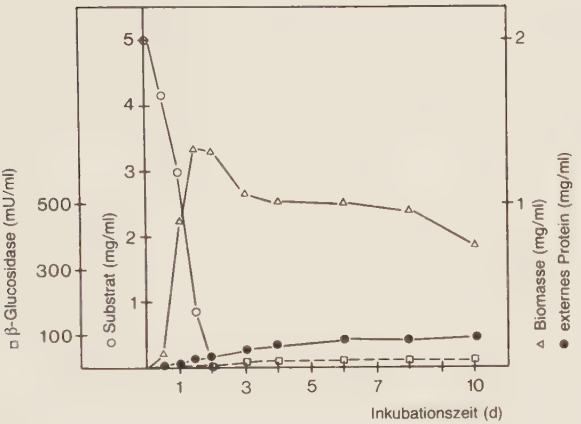



Abb. 13: Wachstum und Synthese extrazellulärer Enzyme auf 0,5 % Glycerin; CMCase war nicht nachweisbar

der Biomasse die Autolyse zu erkennen war. Durch diese Zell-Lysis wurden konstitutive zellgebundene ß-Glucosidasen freigesetzt (0,2 - 0,3 U/mg Myzel nach MANDELS, 1982; NISIZAWA et al., 1971 b).

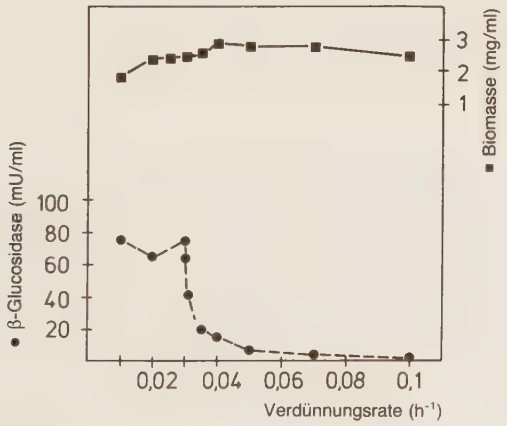



Abb. 14: Kontinuierliche Kultur auf 0,5 % Glucose; die Enzyme wurden im Kulturfiltrat gemessen, CMCase war nicht nachweisbar

Diese Beobachtungen fanden in der kontinuierlichen Kultur mit Glucose als Kohlenstoffquelle ihre Bestätigung. ß-Glucosidasen wurden erst bei niedrigen Durchflußraten im Kulturmedium nachgewiesen, also dort, wo ein optimales Wachstum nicht mehr gewährleistet ist und in zunehmendem Maße Zellen lysieren. Cellulasen wurden auch hier nicht gebildet (Abb. 14).

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Literatur. Beide Substanzen haben jedoch den Nachteil, daß sie eine Katabolitrepression bewirken (NISIZAWA et al., 1971 a). Dennoch wurde Glycerin für den Einsatz als Zusatzsubstrat ausgewählt, weil das Ausmaß der Repression geringer als mit Glucose ist (NISIZAWA et al., 1971 a). Ferner stört Glucose die Enzymtests - den CMCase-Test infolge der reduzierenden Gruppe und den ß-Glucosidase-Test durch Inhibition des Enzyms. Die Katabolitrepression durch Glycerin wurde zu Beginn eines Experiments geduldet, weil die eingesetzte Menge sehr schnell abgebaut wurde (0,2 % innerhalb von 10 Stunden zu 90 % bei einer Myzelkonzentration von 2 mg Trockengewicht pro ml).

Beim Wachstum auf Glycerin wurde in den Zellen eine Anreicherung von Reservestoffen erwartet, die eine Enzymsynthese gewährleisteten, 0,2 % Glycerin entspricht etwa einer $2 \times 10^{-2}$ M Konzentration. Bei einem 90 %igen Abbau zu $2 \times 10^{-3}$ M ist die Katabolitrepression nahezu aufgehoben (NISIZAWA et al., 1971 a).

2. Wachstum und Enzymbildung auf Cellulose

Cellulose ist bekanntlich das natürliche Substrat der Cellulasen und eben auch der beste Induktor der Enzyme. Daher wurde das Wachstum und die Cellulaseproduktion auf Cellulose aufgezeichnet, um die Effektivität anderer induzierender Substanzen beurteilen zu können.

Es wurden mit Avicel-Cellulose und MN 300-Cellulosepulver zwei Cellulosepräparate eingesetzt, die infolge unterschiedlicher mechanischer Vorbehandlung eine unterschiedliche Korngröße hatten.

Dieser Unterschied wirkte sich insofern aus, daß zwar die Maximalwerte aller gemessenen Wachstumsparameter im gleichen Bereich lagen, der Organismus auf der grobkörnigeren Avicel-Cellulose aber wesentlich länger brauchte, um die stationäre Phase zu erreichen. So wurde Avicel in ca. 15 Tagen zu 90 % abgebaut, während dies bei MN 300-Cellulosepulver schon in 6 Tagen möglich war. Stellvertretend wurde hier das Wachstum auf MN 300 aufgezeichnet (Abb. 15). Mit ca. 10 U/ml für die Cellulasen und 0,5 U/ml für die ß-Glucosidasen im Kulturfiltrat entsprechen diese Werte den aus der Literatur bekannten Daten (ANDREOTTI et al., 1977).

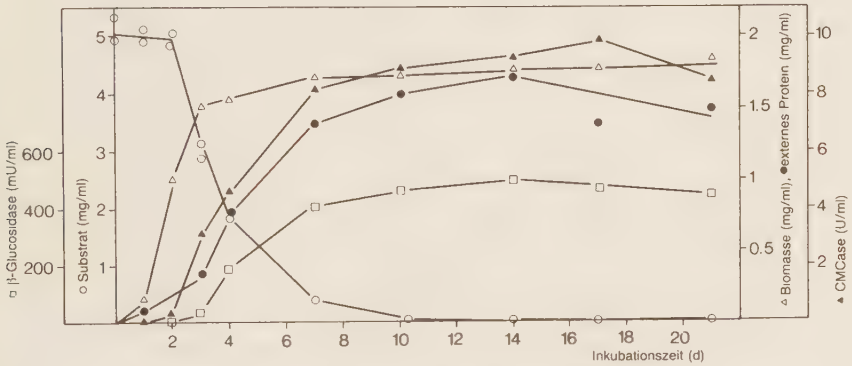



Abb. 15: Wachstum und Synthese extrazellulärer Enzyme auf 0,5 % MN 300-Cellulose

Wenn gewaschene Myzelien mit MN 300 inkubiert wurden, konnten auf 0,5 % Substrat gegenüber den einfachen Wachstumsversuchen auf ca. 14 U/ml gesteigerte CM-Cellulase-Konzentrationen gemessen werden (Abb. 16 a). Wurden bei Versuchsbeginn noch 0,2 % Glycerin in den Ansatz gegeben (Abb. 16 b), so war zunächst eine Repression der Cellulaseproduktion zu beobachten, so daß auch der Abbau der Cellulose verzögert wurde. Da durch das Wachstum auf Glycerin die Zellkonzentration erhöht wurde, konnte anschließend eine erhöhte Enzymausbeute erwartet werden. Es wurde jedoch nur bei 0,16 % und 0,32 % Substrat eine Steigerung der Cellulaseaktivität festgestellt, die aber mit zunehmender Cellu-

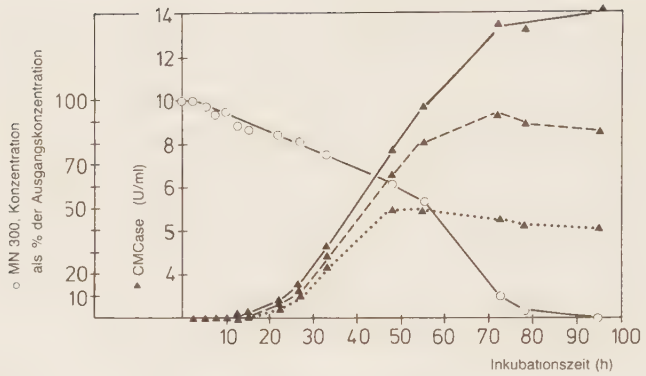



Abb. 16 a:

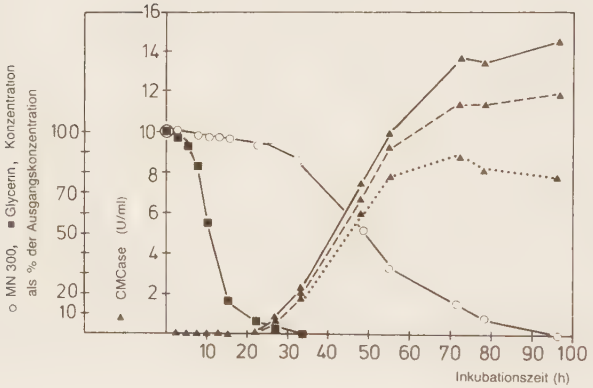



Abb. 16 b:

Abb. 16: Induktion von extrazellulären CMCasen in gewaschenen Myzelien auf MN 300-Cellulose ohne (a) und mit (b) Zusatz von 0,2 % Glycerin; Cellulosekonzentration = 0,5 % (———), 0,32 % (-----), 0,16 % (.....)

losekonzentration prozentual geringer wurde und bei 0,5 % Cellulose fehlte. Man kann also folgern, daß ab einer Cellulosekonzentration von 0,5 % die Enzymkonzentration unter diesen Versuchsbedingungen nicht mehr durch die Erhöhung der Zellkonzentration gesteigert werden kann.

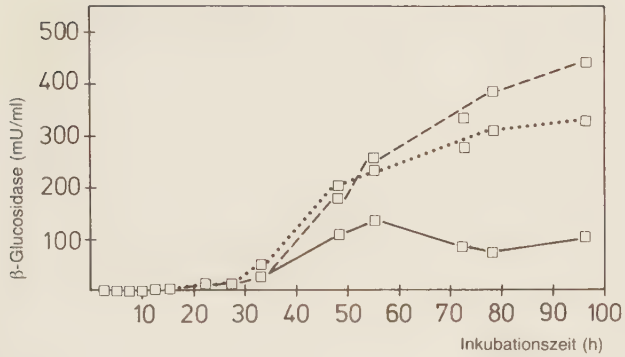



Abb. 16 c:

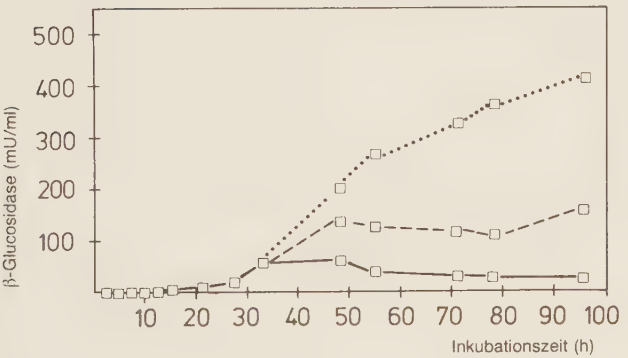



Abb. 16 d:

Abb. 16: Induktion von extrazellulären ß-Glucosidasen in gewaschenen Myzelien auf MN 300-Cellulose ohne (c) und mit (d) Zusatz von 0,2 % Glycerin; Cellulosekonzentration = 0,5 % (———), 0,32 % (-----), 0,16 % (.....)

Bei der Synthese von ß-Glucosidasen nach Induktion durch MN 300-Cellulose konnte eine maximale Ausbeute auf 0,32 % Cellulose erzielt werden (Abb. 16 c). Es erfolgte also eine Steigerung der Enzymsynthese nach Erhöhung der Substratkonzentration bis zu 0,32 % MN 300 unter Einhaltung einer Sättigungskurve. Bei 0,5 % Substrat war eine starke Abweichung von einer Sättigungskurve mit deutlich geringeren Werten zu beobachten. Dieses Verhalten trat bei der Zugabe von Glycerin schon bei 0,32 % auf

(Abb. 16 d), während die Enzymbildung auf 0,16 % Cellulose durch Zusatz von Glycerin gesteigert werden konnte. Eine Erklärung für dieses Verhalten könnte sein, daß bei der Vorgabe einer hohen Myzelkonzentration das Substrat so schnell abgebaut wurde, daß die Synthese von ß-Glucosidasen infolge einer Katabolitrepression eingeschränkt wurde. Dieser Effekt wurde durch den Zusatz von Glycerin noch stärker ausgeprägt, weil in diesem Experiment zunächst eine Vermehrung der Biomasse erreicht wurde, so daß die Cellulose nach der bevorzugten Verwertung des Glycerins noch rascher abgebaut wurde als im Ansatz mit Cellulose allein. Die Voraussetzung für eine solche Erklärung muß aber ein unterschiedlicher Regulationsmechanismus für ß-Glucosidasen und Cellulasen sein, weil die Cellulaseproduktion nicht eingeschränkt wurde. Diese Voraussetzung wurde bestätigt, indem die Cellulaseproduktion durch den Abbau von Glycerin verzögert wurde, die Synthese von ß-Glucosidasen aber nicht. Eine weitere Erklärung könnte die Hemmung des Enzyms im Test durch das Abbauprodukt Glucose sein, doch wurde eine Anreicherung von Glucose nicht beobachtet.

3. Wachstum und Enzymbildung auf Cellobiose

Geht man davon aus, daß zur Induktion von Enzymen niedermolekulare Substanzen in die Zelle aufgenommen werden müssen, kommt man schnell zu der Schlußfolgerung, daß Cellulose wegen der Größe des Moleküls nicht der unmittelbare Induktor von Cellulasen sein kann. Da Cellobiose in Kulturen, die auf Cellulose wachsen, immer als erstes niedermolekulares Abbauprodukt neben den Cellodextrinen nachweisbar ist (WESTERMARK und ERIKSSON, 1975 a; MANDELS und REESE, 1957), wurde diese Substanz vielfach als der natürliche Induktor von Cellulasen angenommen. Eine wichtige Voraussetzung dieser These ist durch die Existenz sehr geringer Konzentrationen an konstitutiven Cellulase-Enzymen erfüllt (NISIZAWA et al., 1971 a, b), die durch Zell-Lysis in das Kulturmedium gelangen. Hierdurch wird eine weitere Induktion durch die Abbauprodukte möglich, die auf diesem Weg aus Cellulose freigesetzt werden können.

Nachdem MANDELS und REESE (1960) erste Hinweise für die Richtigkeit dieser Theorie fanden, konnten SHIN et al. (1978) in kontinuierlichen Kulturen mit *Trichoderma viride* QM 6a auf Cellobiose Cellulasekonzentrationen erreichen, wie sie im Schüttelkolben auf Cellulose erzielt wurden. Dies wurde möglich, weil auf diese Weise die Repression durch die aus Cellobiose freigesetzte Glucose oder durch Cellobiose selbst (MANDELS und REESE, 1960) ausgeschaltet wurde, indem die Substratzufuhr bei niedrigen Durchflußraten so langsam erfolgte, daß sich weder Glucose noch Cellobiose im Medium oder in den Zellen anreichern konnten.

Da bisher mit *Trichoderma reesei* QM 9414 eine kontinuierliche Fermentation mit Cellobiose nicht durchgeführt wurde, wurden die Versuche von SHIN et al. (1978) mit diesem Organismus nachvollzogen und das Ergebnis mit Cellobiose und Cellulose in anderen Versuchsanordnungen verglichen.

Im Schüttelkolben wurde Cellobiose fast ebenso schnell verwertet wie Glucose; auch das Wachstum zeigte einen ähnlichen Verlauf (Abb. 17). Schon diese Versuchsanordnung bestätigte, daß Cellobiose zur Induktion von Cellulasen geeignet ist. Mit einer gegenüber einer Glucosekultur gesteigerten Proteinausscheidung

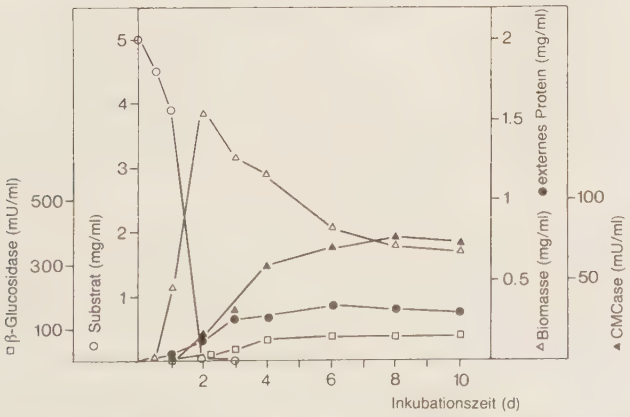



Abb. 17: Wachstum und Synthese extrazellulärer Enzyme auf 0,5 % Cellobiose

ging die Produktion von Cellulasen und ß-Glucosidasen mit je 75 bis 80 mU/ml Kulturfiltrat einher.

In den Versuchen mit gewaschenen Myzelien (Abb. 18 a,b) konnte eine im Verhältnis zur Substratkonzentration gesteigerte Enzyminduktion nachgewiesen werden. Während die Substratkonzentration von 5 mg/ml auf 3,4 mg/ml = $10^{-2}$ M herabgesetzt wurde, konnten trotzdem Cellulasekonzentrationen von ca. 90 mU/ml gemessen werden. Allerdings lagen die Werte der ß-Glucosidase mit 30 mU/ml deutlich niedriger. Beide Enzyme traten mit einem Maximum auf, nach welchem die Aktivität zunächst abnahm und dann wieder anstieg. Der Grund hierfür könnte darin liegen, daß die zur Induktion optimale Cellobiosekonzentration nur kurze Zeit wirksam war, weil das Substrat durch den Organismus verbraucht wurde. Anschließend nahm die Enzymkonzentration wieder zu, weil zellgebundenes Enzym durch Zell-Lysis freigesetzt wurde oder erneu-

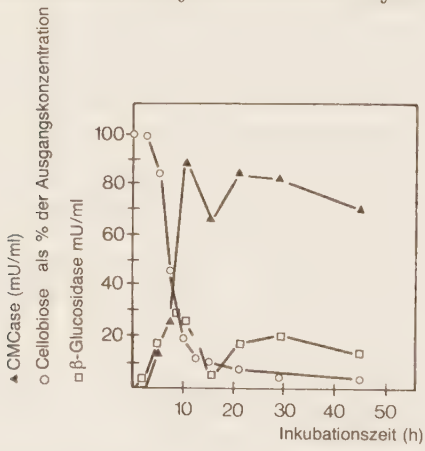



Abb. 18 a:

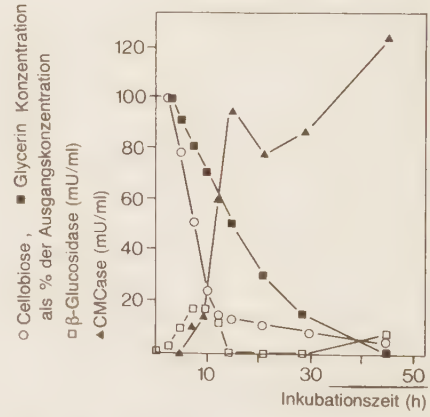



Abb. 18 b:

Abb. 18: Induktion cellulolytischer Enzyme (extrazellulär) in gewaschenen Myzelien auf $10^{-2}$ M Cellobiose ohne (a) und mit (b) Zusatz von 0,2 % Glycerin; $CMCase_{max}$ bei niedrigeren Substratkonzentrationen = a) 0 mU/ml ($10^{-6}$ M), 3,7 mU/ml ($10^{-5}$ M), 7,8 mU/ml ($10^{-4}$ M), 23,4 mU/ml ($10^{-3}$ M); = b) 0 mU/ml ($10^{-6}$ M), 4,3 mU/ml ($10^{-5}$ M), 8,2 mU/ml ($10^{-4}$ M), 25,7 mU/ml ($10^{-3}$ m); die Synthese von ß-Glucosidasen zeigte eine ähnliche Abhängigkeit von der Induktorkonzentration

tes Wachstum auf Zellzersetzungsprodukten erfolgte, nachdem die Cellobiose überwiegend abgebaut war. Die Enzymaktivitäten übertrafen jedoch nicht den ersten Maximalwert. Bei einer Substratkombination aus $10^{-2}$ M Cellobiose und 0,2 % Glycerin wurde die Cellobiose bei der Verwertung bevorzugt. Wie daher zu erwarten war, entstand ein ähnlicher Verlauf der Enzymaktivitäten wie ohne Glycerin, wobei aber die Synthese der Cellulase durch die Anwesenheit des leichter verwertbaren Substrates verzögert wurde. Ebenso erfolgte nach dem ersten Maximum, das keine höheren Werte aufwies als ohne Glycerin, der erneute Anstieg der Aktivität mit Verzögerung. Erst jetzt wurden höhere Werte erreicht als in den primären Maxima, was aber wohl auf ein vermehrtes Wachstum des Pilzes auf der Basis des Glycerins zurückzuführen ist, nachdem die Cellobiose verbraucht war. Die Synthese von ß-Glucosidasen wurde durch die Gegenwart des Glycerins in anderer Weise beeinflußt. Das Konzentrationsmaximum erschien zwar im gleichen Zeitverlauf, war aber wesentlich niedriger. Anschließend war das Enzym ca. 15 Stunden lang nicht nachweisbar. Durch Glycerin wurde also auch auf Cellobiose eine Katabolitrepression der cellulolytischen Enzyme verursacht. Jedoch muß man für Cellulasen und ß-Glucosidasen unterschiedliche Regulationsmechanismen annehmen.

In der kontinuierlichen Kultur auf 0,5 % Cellobiose (Abb. 19) konnte die Enzymproduktion auf etwa 2,5 U/ml CMCase und 180 mU/ml der Aryl-ß-glucosidase gesteigert werden. Diese Werte wurden bei der niedrigen Durchflußrate von 0,02 $h^{-1}$ erreicht. Man kann diese Steigerung einerseits auf die Ausschaltung der Repression durch Cellobiose oder deren Abbauprodukt Glucose zurückführen. Andererseits zeigten schon BROWN und HALSTED (1975), daß bei Anwesenheit eines geeigneten Induktors die Enzymkonzentration durch Reduktion des Wachstums verbessert werden kann. Bei niedrigen Durchflußraten wird das Wachstum von Organismen eingeschränkt, da nun das Substrat vornehmlich zur Erhaltung des Zellstoffwechsels verbraucht wird. Aus diesem Grund nahm die Myzelkonzentration in diesem Experiment mit der Durchflußrate ab.

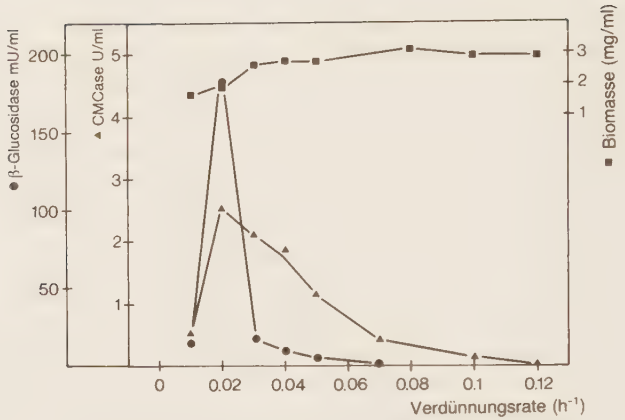



Abb. 19: Kontinuierliche Kultur auf 0,5 % Cellobiose; die Enzyme wurden im Kulturfiltrat gemessen

Aber auch wenn in der kontinuierlichen Kultur die Cellulaseproduktion gegenüber den Schüttelkulturen auf etwa das Zwanzigfache gesteigert werden konnte, so entspricht dies nur einem Viertel der mit Cellulose erzielten Aktivität. Auch SHIN et al. (1978) konnten mit *Trichoderma reesei* QM 6a in der kontinuierlichen Kultur auf Cellobiose nicht die durch Cellulose induzierten Konzentrationen erzielen. Ein natürlicher Induktor sollte aber schon bei Konzentrationen im Bereich von mM, wie im kontinuierlichen Fermentationsverfahren bei niedrigen Durchflußraten, ebenso wirksam sein wie Cellulose in hohen Konzentrationen.

4. Wechselwirkungen zwischen Cellobiosederivaten und cellulolytischen Enzymen

Bei der kontinuierlichen Fermentation von Cellobiose hatte sich gezeigt, daß man die Enzymproduktion steigern kann, wenn man den Induktor nur langsam zuführt und dadurch die Repression der Enzymsynthese durch Cellobiose besonders aber durch deren Abbauprodukt Glucose ausschaltet oder zumindest verringert. Eine weitere Möglichkeit, die Repression herabzusetzen, ist die Verän-

derung der Grundstruktur von Cellobiose. Auf diese Weise kann die Katabolitrepression verhindert werden, weil der Abbau der Substanz nicht mehr möglich ist; oder sie kann eingeschränkt werden, weil z.T. derivatisierte Glucose freigesetzt wird.

a) Thiocellobiose

In Experimenten mit gewaschenen Myzelien von *Schizophyllum commune* hatte sich Thiocellobiose als ein sehr potenter Induktor von Polysaccharasen u.a. auch der Cellulasen erwiesen, ohne abgebaut zu werden (RHO et al., 1982). Dabei wurden die Maximalwerte, die auf Cellulose und Cellobiose erreicht wurden, auf Thiocellobiose übertroffen.

Von Trichoderma reesei wurde die Thiocellobiose ebenfalls nicht abgebaut, obwohl der Organismus 6 Tage mit der Substanz inkubiert wurde. Es konnte gezeigt werden, daß die Thiocellobiose von cellulolytischen Enzymen aus *Trichoderma reesei* nicht umgesetzt werden kann. Während von einem Cellulasepräparat aus diesem Organismus ca. 140 nmol Cellobiose pro ml und min in einem 3 mM Ansatz hydrolysiert wurden, erfolgte bei Thiocellobiose unter gleichen Bedingungen keine Freisetzung von Glucose.

In Versuchen mit gewaschenen Myzelien konnte aber auch keine Induktion von cellulolytischen Enzymen nachgewiesen werden. CMCase-Aktivitäten fehlten völlig und ß-Glucosidase zeigte keine Abweichung von den Kontrollen. Das Resultat kann auch nicht dem Fehlen einer metabolisierbaren Kohlenstoffquelle zugeschrieben werden, da auch nach Zusatz von 0,2 % Glycerin beim Start der Kultur keine Enzymsynthese erfolgte. Nach einem 90 %igem Abbau des Glycerins hätte das restliche Glycerin durchaus eine Synthese von cellulolytischen Enzymen unterstützen können.

Das Ausbleiben der Cellulaseproduktion könnte dadurch erklärt werden, daß die Thiocellobiose nicht in die Zelle aufgenommen werden konnte, weil eine spezifische Permease fehlte. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde der Organismus in 20 ml-Kulturen auf 0,5 % Cellobiose kultiviert, um die Bildung einer Cello-

biose-Permease zu induzieren, die eventuell auch mit Thiocellobiose wirksam ist. Nach dreitägiger Inkubation war die Cellobiose verbraucht und eine Myzelkonzentration von 2,72 mg Trockengewicht pro ml Kulturmedium erreicht. Sodann wurden zu verschiedenen Ansätzen $10^{-3}$ M Cellobiose, $10^{-3}$ M und 2 x $10^{-3}$ M Thiocellobiose jeweils in konzentrierter Lösung und in die Kontrollansätze das entsprechende Volumen $H_2O$ steril zugegeben. Der Verlauf der Enzymkonzentration wurde täglich verfolgt.

Die durch die Vorinkubation mit 0,5 % Cellobiose induzierten Enzyme erreichten in den Kontrollansätzen 165 mU/ml CMCase und 85 mU/ml ß-Glucosidase (Abb. 20). Die Aktivitäten beider Enzyme wurden durch den Zusatz von Thiocellobiose mit steigender Konzentration zunehmend vermindert. Während durch die Zugabe von $10^{-3}$ M Cellobiose gegenüber der Kontrolle eine Steigung der CMCase-Aktivität beobachtet wurde, wie sie aus den anderen Versuchen mit Cellobiose (Abb. 18) erwartet werden konnte, blieb die CMCase-Konzentration mit Thiocellobiose deutlich niedriger. Im Ansatz mit 2 x $10^{-3}$ M Thiocellobiose ging sie sogar unter den Ausgangswert zurück, der vor der Zugabe der Substanz gemessen wurde.

Mit der ß-Glucosidase ergab sich ein ähnliches Resultat (Abb. 20 b), wobei das Enzym durch Cellobiose zunächst reprimiert wurde (vergl. MANDELS und REESE, 1960), bevor eine Angleichung an die Kontrolle erfolgte.

Dieser Versuch zeigte, daß Thiocellobiose in die Zellen gelangte, weil die Enzymsynthese nur im Zellinnern beeinflußt werden kann. Doch statt der erwarteten Steigerung der Enzymsynthese erfolgte offenbar eine Repression. Hierbei mußte die Thiocellobiose selbst wirksam werden, da mit Rohextrakten und Kulturfiltraten von *Trichoderma reesei* mit aktiven CMCasen und ß-Glucosidasen keine Hydrolyse des Moleküls bewirkt werden konnte.

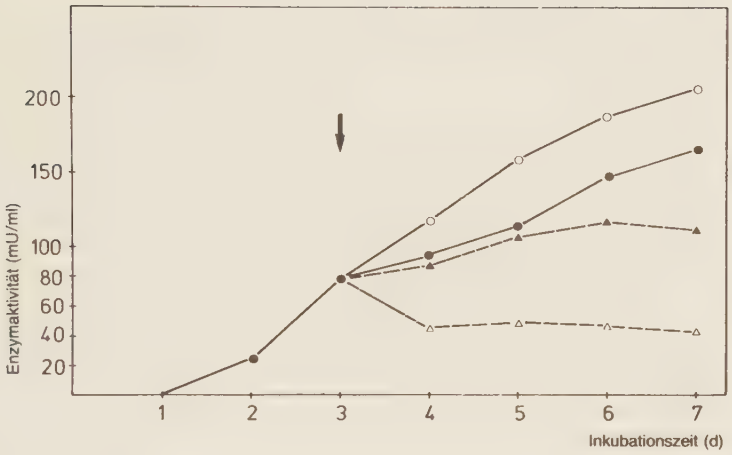



Abb. 20 a:

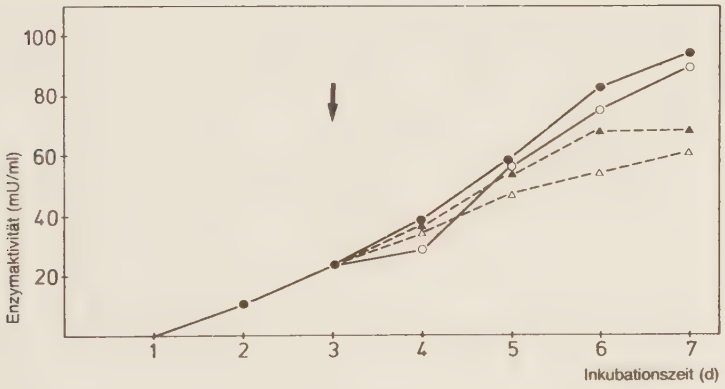



Abb. 20 b:

Abb. 20: Einfluß von Thiocellobiose auf die Induktion cellulolytischer Enzyme durch 0,5 % Cellobiose; a) CMCase, b) Aryl-ß-Glucosidase; nach dreitägiger Inkubation auf 0,5 % Cellobiose (Pfeil) wurden folgende Substanzen zugesetzt: $H_2O$ als Kontrolle (●——●), $10^{-3}$ M Cellobiose (o——o), $10^{-3}$ M Thiocellobiose (▲----▲), 2 x $10^{-3}$ M Thiocellobiose (△----△)

Aus diesen Ergebnissen ging allerdings nicht hervor, ob nun tatsächlich eine Repression vorlag oder schon gebildete Enzyme lediglich inhibiert wurden. Im Falle einer Inhibition der Enzyme besteht aber durchaus die Möglichkeit, daß eine Induktion stattfand, aber auf diese Weise nicht zu erkennen war. Daher wurde ferner untersucht, ob CMCase und ß-Glucosidase durch Thiocellobiose gehemmt werden. Jedoch zeigte sich mit Enzymen aus dem Kulturfiltrat einer 0,5 % MN 300-Kultur keine Hemmung von CM-Cellulase und ß-Glucosidase in Gegenwart von $10^{-7}$ M bis $10^{-2}$ M Thiocellobiose. Die Substratkonzentration betrug für CMC 0,005 bis 0,5 % und für p-NPG und Cellobiose $10^{-4}$ bis $10^{-2}$ M. Hieraus ist zu folgern, daß die Enzyme durch die Thiocellobiose reprimiert wurden.

b) Cellobionsäure

Die Untersuchung der Induktion von Cellulasen in *Trichoderma reesei* durch Cellobionsäure ergab sich aus Berichten, daß native Cellulose unabhängig von der Herkunft etwa 0,28 % Carboxylgruppen enthält (SCHMIDT et al., 1931, 1932; HILLER und PASCU, 1946; SCHMIDT, 1965). Infolgedessen wird beim Abbau von Cellulose Cellobionsäure als Produkt nachgewiesen (ca. 10 mg/l bei 0,5 % Cellulose; nach WESTERMARK und ERIKSSON, 1975). Ferner wird die Säure von verschiedenen cellulolytischen Pilzen durch die Wirkung von Oxidasen oder Dehydrogenasen aus Cellobiose gebildet (AYERS et al., 1978; WESTERMARK und ERIKSSON, 1975; DEKKER 1980; COUDRAY et al., 1982). Die Existenz eines solchen oxidativen Enzyms in *Trichoderma reesei* deuteten erste Ergebnisse von ERIKSSON und WESTERMARK (1974) an, doch fehlt der exakte Nachweis des Enzyms bis heute. Daß Cellulasen durch Cellobionsäure induziert werden können, beobachteten CANEVASCINI et al. (1979) in *Sporotrichum thermophile*. Auch bei *Trichoderma* fanden BRUCHMANN et al. (1978) eine solche Induktion, die jedoch nicht näher beschrieben wurde.

$b_1$) Induktion von Cellulasen durch Cellobionsäure
In Schüttelkulturen (Abb. 21) wurde die Cellobionsäure trotz der Carboxylgruppe relativ rasch verwertet. Wenn auch Cellobiose wesentlich schneller verbraucht wurde, so waren doch von der Cellobionsäure nach 2 Tagen annähernd 70 % abgebaut. Der Umsatz des restlichen Substrats erfolgte dann langsamer, so daß die stationäre Wachstumsphase länger dauerte als auf Cellobiose. Das Maximum der Myzelkonzentration war niedriger als mit Glucose oder Cellobiose, weil das Substrat stärker oxidiert war.

Es erfolgte zwar eine Synthese der beiden getesteten Enzyme, doch waren die maximalen CMCase-Konzentrationen von ca. 8 mU/ml verschwindend gering. Auch die Aktivitäten der ß-Glucosidasen ließen mit etwa 35 mU/ml keine besonders deutlichen Abweichungen von Kontrollen mit Glycerin (ca. 20 - 25 mU/ml) erkennen. Dennoch war ein Maximum beider Enzymaktivitäten nach 3 - 4 Tagen ausgebildet, während auf Glycerin die Konzentration der ß-Glucosidase nur langsam auf ein festes Niveau anstieg und Cellulasen gar nicht meßbar waren. Aus diesem Grunde wurde untersucht, ob andere Versuchsanordnungen nicht bessere Versuchsbedingungen bieten konnten, um zu vermeiden, daß das Substrat vorwiegend zum Wachstum statt zur Enzyminduktion diente.

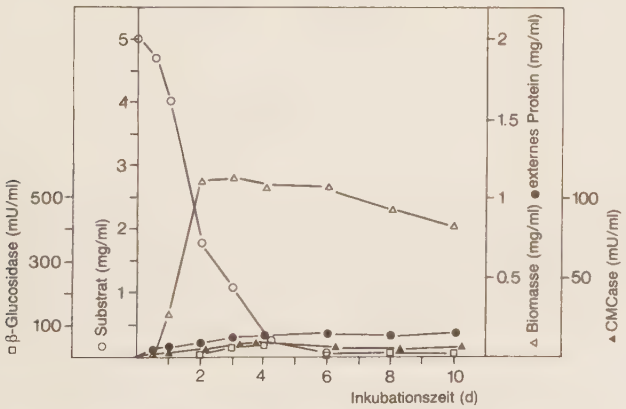



Abb. 21: Wachstum und Synthese extrazellulärer Enzyme auf 0,5 % Cellobionsäure; $CMCase_{max}$ = 8 mU/ml

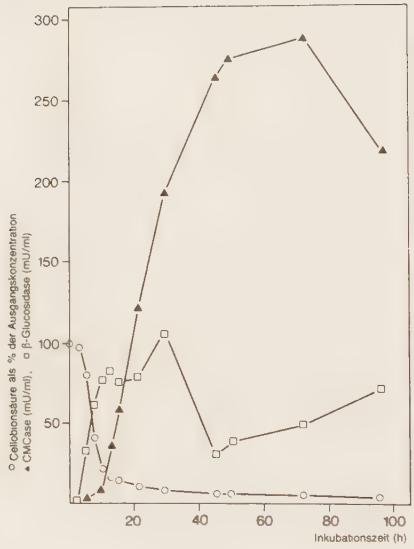



Abb. 22 a:

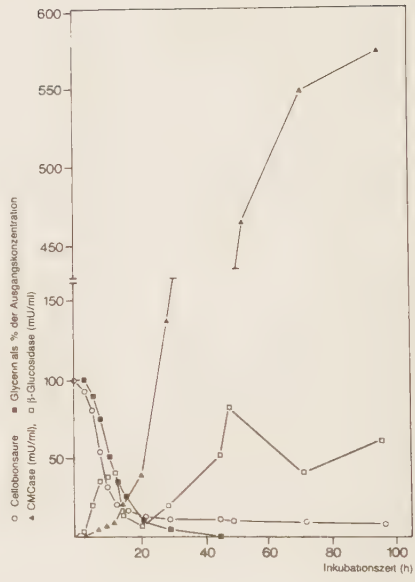



Abb. 22 b:

Abb. 22: Induktion cellulolytischer Enzyme (extrazellulär) in gewaschenen Myzelien auf $10^{-2}$ M Cellobionsäure ohne (a) und mit (b) Zusatz von 0,2 % Glycerin; maximale CMC-ase-Aktivitäten bei niedrigeren Substratkonzentrationen: a) 0 ($10^{-6}$ M), 4,4 mU/ml ($10^{-5}$ M), 13,9 mU/ml ($10^{-4}$ M), 96,0 mU/ml ($10^{-3}$ M); b) = 0 ($10^{-6}$ M), 3,1 mU/ml ($10^{-5}$ M), 19,3 mU/ml ($10^{-4}$ M), 102,1 mU/ml ($10^{-3}$ M); die Synthese von ß-Glucosidasen zeigte eine ähnliche Abhängigkeit von der Induktorkonzentration.

Wenn gewaschene Myzelien von *Trichoderma reesei* mit Cellobionsäure inkubiert wurden, stellten sich ähnliche Induktionsmuster ein wie beim Wachstum gewaschener Myzelien auf Cellobiose, doch wurden wesentlich höhere Aktivitäten erreicht (Abb. 22 a). Wenn Glycerin als zusätzliches Substrat eingesetzt wurde (Abb. 22 b), verursachte es einen weiteren Anstieg der CM-Cellulase von 290 auf 570 mU/ml, wobei aber die Synthese um einige Stunden verzögert war. Ebenso wurde die Bildung der ß-Glucosidase durch Glycerin reprimiert, wie schon mit Cellobiose als induzierendem Substrat beobachtet wurde. Die Steigerung der CMCase-Konzentration auf Glycerin kann nicht allein auf die Anwesenheit dieser zweiten Kohlenstoffquelle zurückgeführt werden; denn hierdurch kann nur eine Zunahme der Myzelkonzentration um etwa 50 % kalkuliert werden, die Enzymaktivität aber nahm um ca. 100 % zu. Beide Substrate wurden fast zur gleichen Zeit umgesetzt, während Cellobiose dem Glycerin eindeutig vorgezogen wurde.

Da auf Cellobionsäure in gewaschenen Myzelien höhere Cellulasekonzentrationen gemessen werden konnten als auf Cellobiose, wurden entsprechende Relationen auch in kontinuierlichen Kulturen erwartet. Doch blieben hier die Aktivitäten auf 0,2 % Cellobionsäure deutlich unterhalb der auf 0,2 % Cellobiose nachweisbaren Enzymmengen, wie Tab. 1 zeigt.

| Substrat | Cellobiose | | Cellobionsäure | |
|---|---|---|---|---|
| Durchflußrate ($h^{-1}$) | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,01 |
| CMCase ( U/ml) | 2,2 | 2,56 | 0,298 | 0,719 |
| ß-Glucosidase (mU/ml) | 266 | 308 | 91 | 166 |

Tab. 1: Kontinuierliche Kulturen auf 0,2 % Cellobiose und 0,2 % Cellobionsäure; Kulturvolumen = 100 ml, Temperatur = 27 °C, Belüftung = 1 v/vm, Rührgeschwindigkeit = 400 Upm, ß-Glucosidase = Aryl-ß-glucosidase

Daß auf Cellobionsäure in der kontinuierlichen Kultur niedrigere Enzymkonzentrationen gebildet werden als auf Cellobiose, könnte verursacht worden sein, indem sich bei einer solchen Versuchsanordnung eher die Repression cellulolytischer Enzyme durch Gluconsäure (WAGNER und SISTIG, 1979) bemerkbar macht. Wenn auch durch Dünnschichtchromatographie keine Gluconsäure nachgewiesen werden konnte, so wurde sie dennoch ständig aus dem Substrat freigesetzt und konnte ständig auf den Organismus wirken. Bei Versuchen mit gewaschenen Myzelien könnte dieser Effekt weniger stark ausgeprägt sein, weil die Gluconsäure wohl in Relation zur kontinuierlichen Kultur nur kurzfristig wirken konnte.

$b_2$) Differenzierung Cellobionsäure-spaltender Enzyme
In den Versuchen zur Enzyminduktion hatte sich Cellobionsäure als gutes Wachstumssubstrat erwiesen, das trotz der Carboxylgruppe sehr schnell abgebaut wurde. Daher wurde untersucht, auf welchem Wege die Cellobionsäure durch *Trichoderma* verwertet wird. Einen ersten Hinweis gab der Bericht von MOELLER (1973), daß Cellobionsäure bei *Aspergillus niger* durch ß-Glucosidasen hydrolysiert wird, wobei aber die Mitwirkung einer Lactonase notwendig ist.

Um zu überprüfen, ob Cellobionsäure auch bei *Trichoderma reesei* enzymatisch gespalten wird, wurde analog zur Messung der Cellobiase-Aktivität zunächst untersucht, ob Glucose aus Cellobionsäure freigesetzt wird.

Es wurden Rohextrakte und Kulturfiltrate von Kulturen getestet, die drei Tage auf 0,2 % Glucose, Glycerin, Cellobiose, Cellobionsäure, Lactose oder MN 300-Cellulose gewachsen waren. In allen Präparaten konnte die Bildung von Glucose aus Cellobionsäure nachgewiesen werden. Ebenfalls konnten in allen Präparaten ß-Glucosidase-Aktivitäten mit Cellobiose gemessen werden. Infolge der Konzentrierung bei der Präparation ergaben sich in allen Rohextrakten wesentlich höhere Aktivitäten als im zugehörigen Kulturfiltrat.

In allen Fällen zeigte sich eine pH-Abhängigkeit von Cellobiase und Cellobionsäure-spaltender Aktivität, wie in Abb. 23 stellvertretend für den Rohextrakt einer Kultur auf MN 300-Cellulose dargestellt wurde.

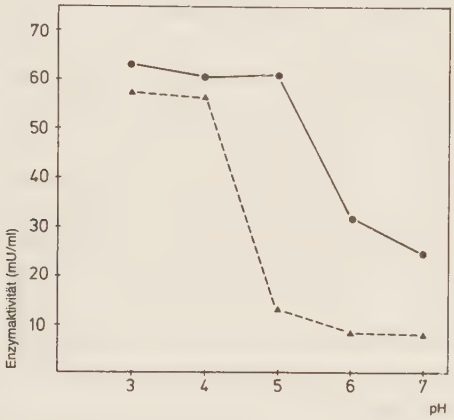



Abb. 23: Aktivitäten der ß-Glucosidasen im Rohextrakt einer drei Tage lang auf 1 % MN 300-Cellulose gewachsenen Kultur von *Trichoderma reesei* QM 9414 gegenüber Cellobiose (●——●) und Cellobionsäure (▲---▲) in Abhängigkeit vom pH

Im Bereich von pH 3 bis 4 wurden ähnliche, in einigen Präparaten auch gleiche Aktivitäten für beide Reaktionen beobachtet. Während sich aber der optimale Bereich der Cellobiase von pH 3 bis pH 5 erstreckte, nahm die Reaktionsgeschwindigkeit der Cellobionsäurespaltung oberhalb pH 4 sehr rasch ab. Diese unterschiedliche pH-Abhängigkeit der beiden Aktivitäten wird wohl dadurch bedingt, daß Cellobionsäure mit ihrer Lactonform nach folgendem Schema (BRUCHMANN, 1978; RUSKE, 1970) im Gleichgewicht steht:

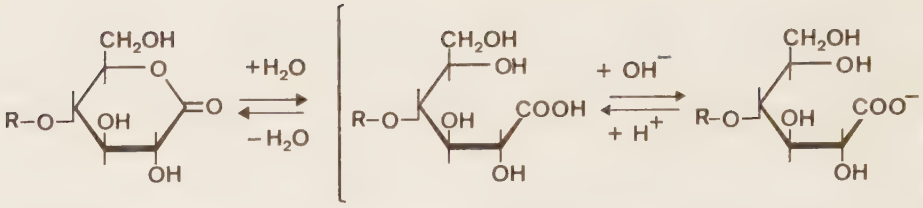



Abb. 24: Schematische Darstellung der Gleichgewichtslage zwischen Cellobionolacton und Cellobionsäure, R = Glucose

Bei pH 3 und 4 wird die Säure vorwiegend undissoziiert vorliegen und bis zur Einstellung eines Gleichgewichts spontan zum Lacton kondensieren. Mit steigendem pH wird zunehmend die offene dissoziierte Säure begünstigt. Es konnte gezeigt werden, daß bei pH 4 etwa 30 % der Säure als Lacton vorliegen, während bei pH 7 kein Lacton nachweisbar war. Man kann daher vermuten, daß Cellobionolacton das eigentliche Substrat bei der enzymatischen Spaltung von Cellobionsäure ist. Die tatsächlichen Substratverhältnisse für die Cellobionsäurespaltung ergeben sich aus der Gleichgewichtslage zwischen der freien Säure und dem Lacton bei pH 4 und der pH-Abhängigkeit der Hydrolyse: Mit abnehmendem pH-Wert verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten des Lactons. Ebenso nimmt auch die Reaktionsgeschwindigkeit der Cellobionsäurehydrolyse zu. Hieraus ist zu folgern, daß nicht Cellobionsäure selbst, sondern das Lacton das eigentliche Substrat für das oder die Enzyme ist. Dies wird verständlich, wenn man bedenkt, daß bei Cellobionsäure der Gluconsäureanteil offenkettig, die Lactonform aber ringförmig vorliegt. In Lösung liegen sowohl Cellobiose als auch Cellobionolacton in der "Sesselform" quasi fixiert vor (RUSKE, 1970):

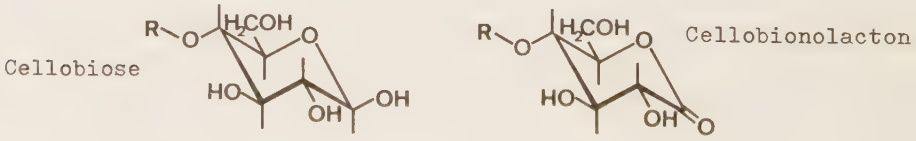



Abb. 25: Vergleich der Konformationen von Cellobiose und Cellobionolacton, R = Glucose

Aus dieser Ähnlichkeit der Moleküle ist zu folgern, daß Cellobionolacton das Substrat bei der Hydrolyse von Cellobionsäure ist. Sollten ß-Glucosidasen die Hydrolyse bewirken, so wird deren Aktivitätsverlust bei der Senkung des pH-Werts (STERNBERG und MANDELS, 1976, 1980) durch die gleichzeitig stattfindende Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten des Lactons aufgehoben.

Da die besten Aktivitäten der Cellobionsäurehydrolyse bei pH 3 - 4 gemessen wurden, ß-Glucosidasen aber bei pH 3 nicht ihre optimale Aktivität entfalten (STERNBERG und MANDELS, 1976, 1980), wurde der Reaktionsansatz zur Messung der Cellobionsäurehydrolyse in allen weiteren Versuchen bei pH 4 inkubiert.

In allen Vorversuchen waren auf MN 300-Cellulose die höchsten Aktivitäten der Cellobiase und der Cellobionsäurehydrolyse erzielt worden. Aus diesem Grunde sollte auf diesem Substrat das Enzympräparat für weitere Untersuchungen gewonnen werden. Es wurde daher zunächst die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Wachstumszeit auf 1 % MN 300-Cellulose verfolgt, um den optimalen Zeitpunkt für die Ernte der Kulturen zu finden.
Im Rohextrakt war ein annähernd kongruenter Verlauf von cellobiose- und cellobionsäurespaltender Aktivität mit einem Maximum nach vier Tagen zu erkennen (Abb. 26 a). Im Kulturfiltrat traten jedoch deutliche Unterschiede auf, wobei die Spaltung der Cellobionsäure erheblich niedrigere Aktivitäten als die Cellobiase aufwies (Abb. 26 b). Diese Abweichung muß man auf die Anwesenheit hoher Cellulasekonzentrationen im Kulturfiltrat zurückführen, durch die wohl Cellobiose nicht aber Cellobionsäure hydrolysiert wird; denn im Rohextrakt, der nur geringe Cellulaseanteile enthielt, fand man keine signifikante Abweichung der Cellobionsäurehydrolyse von der Cellobiaseaktivität (Abb. 26). Dieser Versuch zeigte, daß der Rohextrakt von vier Tage alten Kulturen, die auf 1 % MN 300-Cellulose gewachsen waren, für weitere Versuche am besten geeignet war, da einerseits der Cellulasenanteil niedrig war und andererseits schon bei der Präparation eine Konzentrierung der Enzyme möglich war.

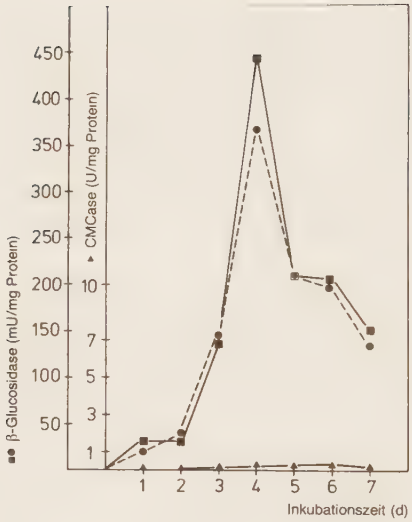



Abb. 26 a:

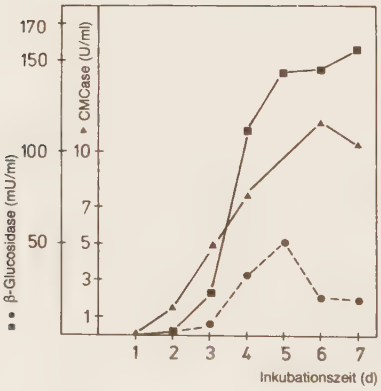



Abb. 26 b:

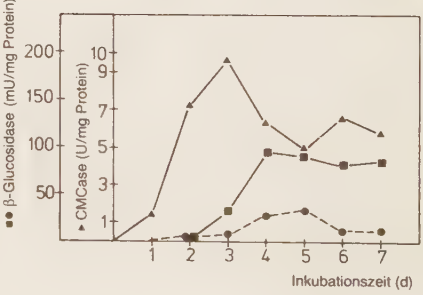



Abb. 26 c:

Abb. 26: Aktivitäten der ß-Glucosidasen gegenüber Cellobiose (■——■) und Cellobionsäure (●---●) und die CMCase (▲——▲) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit auf 1 % MN 300-Cellulose;
a) spezifische Aktivitäten im Rohextrakt
b) Aktivitäten im Kulturfiltrat
c) spezifische Aktivitäten im Kulturfiltrat

Mit einem solchen Rohextrakt konnte auch die Freisetzung von Gluconsäure aus der Cellobionsäure nachgewiesen werden. Nach der Aktivitätsbestimmung über den Nachweis der Glucose waren bei 74,4 mU/ml etwa 291,6 µg Gluconsäure pro ml Testansatz zu erwarten. Im spezifischen Nachweis der Gluconsäure ergaben sich im gleichen Testansatz pro ml 298,3 µg mit dem enzymatischen Verfahren und 299,1 µg in der Konzentrationsbestimmung mittels Isotachophorese. Bei der Aktivitätsbestimmung über den Nachweis von Glucose wurden leicht geringere Hydrolyseraten gemessen, weil durch die ß-Glucosidasen im Reaktionsansatz Transglycosylierungen katalysiert werden können (VAHERI et al., 1979).

Da mit den drei möglichen Bestimmungsmethoden bei der Hydrolyse von Cellobionsäure eine gute Übereinstimmung erzielt wurde, wurde in allen weiteren Untersuchungen die Reaktionsgeschwindigkeit lediglich durch die enzymatische Bestimmung der freigesetzten Glucose gemessen. Die beiden Verfahren zur Bestimmung der Gluconsäure wurden nur in einigen Fällen zur Kontrolle der Ergebnisse hinzugezogen.

In den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, welche Enzyme für die Hydrolyse von Cellobionsäure verantwortlich sind. Es wurde zunächst überprüft, ob bei *Trichoderma reesei* ähnlich wie bei *Aspergillus niger* eine Lactonase als Hilfsenzym an der Hydrolyse von Cellobionsäure (MOELLER, 1973) beteiligt ist. Dazu wurden Rohextrakte, die hohe Hydrolyseraten mit Cellobionsäure bewirkten (100 - 150 mU/ml), unter unterschiedlichen Bedingungen (pH, Temperatur) mit Galactonolacton, Gluconolacton und Cellobionsäure inkubiert. Die Veränderung des Lactongehaltes wurde mit Hydroxylamin bestimmt. In keinem Fall konnte jedoch eine Abweichung von der Spontanhydrolyse der beiden monomeren Lactone festgestellt werden. Auch wurde der Lactongehalt von Cellobionsäure während einer Versuchsdauer von 30 min. nicht verändert. Rohextrakte von *Trichoderma reesei* enthalten also keine Lactonase, so daß auch keine Lactonase an der Umsetzung von Cellobionsäure beteiligt sein kann. Die Mitwirkung einer Lactonase erscheint auch nicht notwendig, da Cellobionsäure in Lösung im-

mer in Abhängigkeit vom pH mit der Lactonform im Gleichgewicht steht. Eine Lactonase beschleunigt aber lediglich die Einstellung des Gleichgewichts.

Nun gab es die Alternativen, daß Cellobionsäure durch spezifische Enzyme oder durch ß-Glucosidasen hydrolysiert wird. Die Differenzierung erfolgte durch Auftrennung der Proteine des Rohextraktes mittels Disk-Elektrophorese in Polyacrylamid-Rundgelen und Gelfiltration an Sephacryl-S 300.

Durch Disk-Elektrophorese ließen sich die cellobionsäurespaltenden Enzyme nicht von den ß-Glucosidasen unterscheiden: Im sauren Elektrophoresesystem (Abb. 27 a) konnte nur eine Cellobiase nachgewiesen werden, die annähernd die gleiche Aktivität gegen Cellobionsäure hatte. Im alkalischen System (Abb. 27 b) erfolgte eine Auftrennung von drei verschiedenen ß-Glucosidasen, die sich offensichtlich in ihrer Affinität zu beiden Substraten unterscheiden. In alkalischen Gelen wurde die Quantifizierung erschwert, weil infolge des hohen pH die Pufferkapazität des Acetatpuffers im Bestimmungsansatz nicht ausreichte, um exakt pH 4 einzustellen. Daher wurde die Hydrolyse von Cellobionsäure meist zu niedrig gemessen, weil im Ansatz nur pH-Werte um 5 vorlagen. Dennoch kann man aus den Aktivitätsverhältnissen und aus der Wanderstrecke in beiden Systemen schließen, daß die aktive Proteinbande im sauren System der obersten ß-Glucosidase-Bande (nahe der Kathode) im alkalischen System entspricht. Durch Variation der Gelstärke oder Erhöhung des pH-Wertes auf pH 10,3 konnte das Ergebnis nicht wesentlich verändert werden.

Vor der Gelfiltration wurde der Rohextrakt durch eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung angereichert, und die 40 - 80 %-Fraktion durch Ultrafiltration über eine Diaflo-PM10-Membran konzentriert. Die Chromatographie an Sephacryl-S 300 erbrachte das gleiche Ergebnis wie die Elektrophorese im alkalischen System: Im Rohextrakt von *Trichoderma reesei* existieren drei ß-Glucosidasen, die sowohl Cellobiose als auch Cellobionsäure hydrolysieren können (Abb. 28). Sie haben jedoch unterschiedliche Affini-

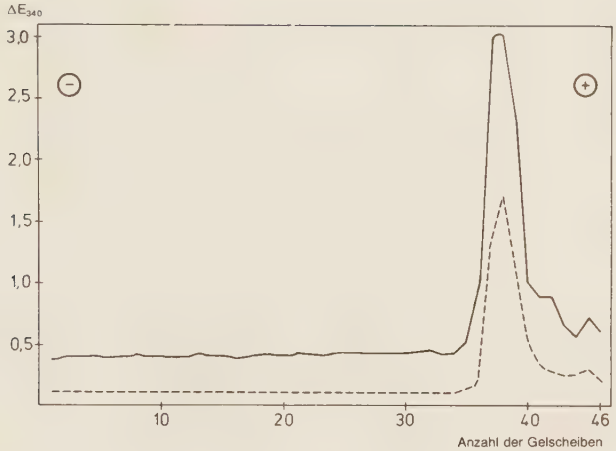



Abb. 27 a:

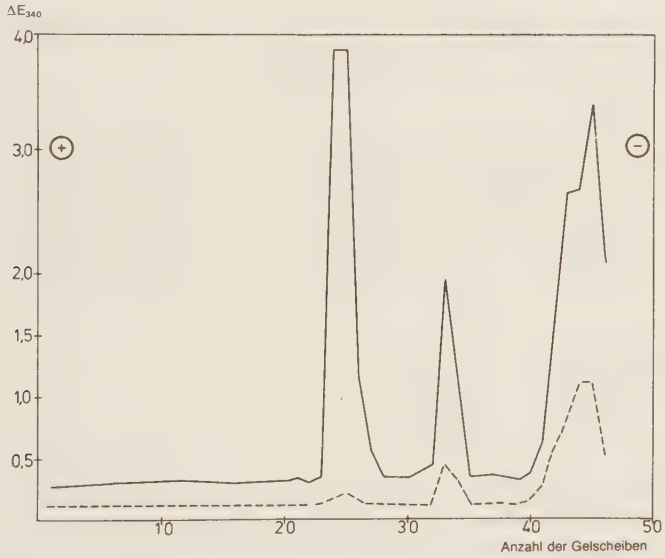



Abb. 27 b:

Abb. 27: Gelelektrophoretische Trennung der ß-Glucosidasen im Rohextrakt einer vier Tage alten Kultur auf 1 % MN 300-Cellulose: Hydrolyse von Cellobiose (———) und Cellobionsäure (-----);
a) saures Gelsystem
b) alkalisches Gelsystem

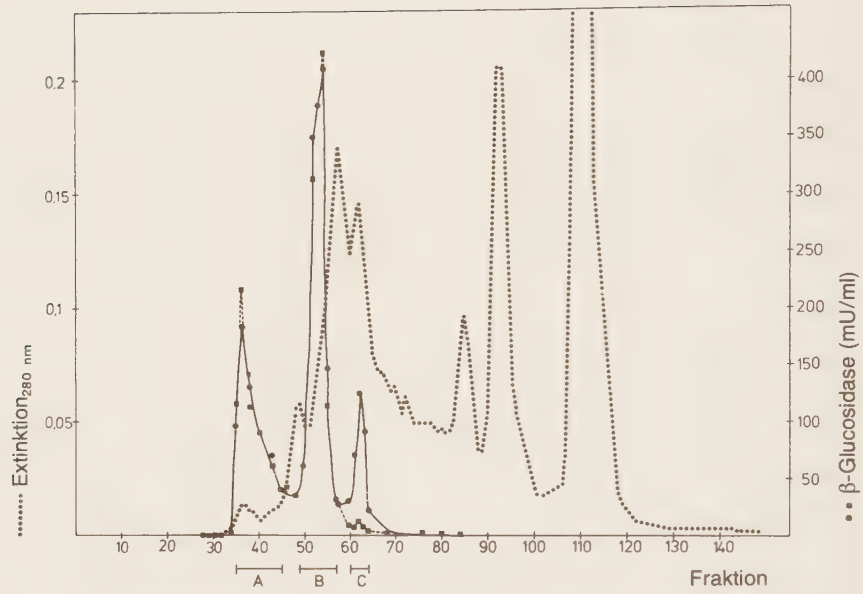



Abb. 28: Chromatographie eines vorgereinigten Rohextraktes aus einer vier Tage alten Kultur auf 1 % MN 300-Cellulose an Sephacryl 300; Probenvolumen: 2 ml; Durchfluß: 10,3 ml/h; Fraktionsvolumen: 5,15 ml; die durch A, B und C markierten Fraktionen wurden jeweils vereinigt; ● Cellobiase, ■ enzymatische Hydrolyse von Cellobionsäure; Ausschlußvolumen = 185 ml (Fraktion 36)

täten zu beiden Substraten. Nachdem jeweils die Fraktionen der aktiven Proteinbanden vereinigt worden waren (vergl. Abb. 28), ergab eine elektrophoretische Analyse (Abb. 29), daß die drei Fraktionen neben den ß-Glucosidasen noch andere Proteine als Verunreinigung enthielten. Dennoch wurden diese Präparate in weiteren Untersuchungen eingesetzt, da sie jeweils nur ein Enzym mit ß-Glucosidase-Aktivität aufwiesen. Eine Übersicht über die Verteilung der Enzymaktivitäten in den vereinigten Proteinfraktionen vermittelt Tabelle 2: In der Protein-Bande "A" lag eine ß-Glucosidase mit gleicher Aktivität gegenüber beiden Substraten vor. Die Bande "C" enthielt eine Endocellulase, die auch Cellobiose nicht aber Cellobionsäure gut umsetzen konnte.

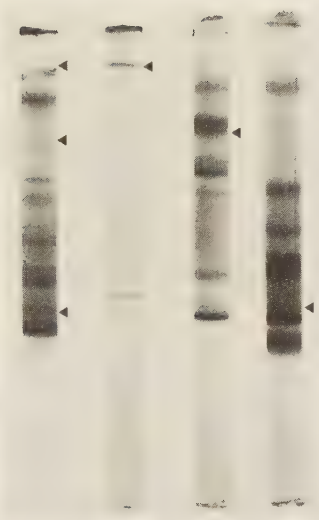


Abb. 29: Analytische Polyacrylamidgel-Elektrophorese im alkalischen System, die aktiven Banden sind durch Pfeil ◄ markiert, von links nach rechts:
a) Rohextrakt (300 µg Protein)
b) Fraktion A ( 40 µg Protein)
c) Fraktion B (150 µg Protein)
d) Fraktion C (300 µg Protein)

| | "A" | "B" | "C" | Rohextrakt |
|---|---|---|---|---|
| Cellobiose | 0,109 | 0,247 | 0,079 | 1,260 |
| Cellobionsäure-Hydrolase | 0,107 | 0,221 | 0,005 | 1,190 |
| Aryl-ß-Glucosidase | 0,061 | 0,189 | 0,115 | 1,793 |
| CMCase | 0 | 0,012 | 0,249 | 1,346 |

Tab. 2 a: Enzymaktivitäten (U/ml) in den Proteinbanden nach der Chromatographie des Rohextraktes an Sephacryl-S 300

| | "A" | "B" | "C" | Rohextrakt |
|---|---|---|---|---|
| Protein (mg/ml) | 0,0056+ | 0,058 | 0,113 | 15,7 |
| Cellobiase | 19,4 | 4,3 | 0,7 | 0,0803 |
| Cellobionsäure-Hydrolase | 19,1 | 3,8 | 0,047 | 0,076 |
| Aryl-ß-Glucosidase | 10,8 | 3,25 | 1,02 | 0,114 |
| CMCase | 00 | 0,21 | 2,2 | 0,086 |

+) Diese Angabe ist sehr ungenau, da die Proteinkonzentration im Bereich der Nachweisgrenze lag.

Tab. 2 b: Spezifische Aktivitäten (U/mg Protein) (Proteinbestimmung nach LOWRY) nach der Chromatographie des Rohextraktes an Sephacryl-S 300

Die geringe CMCase-Aktivität in Bande "B" war wohl auf eine Überlappung mit der Bande "C" zurückzuführen. Es ergab sich eine ca. 250-fache Anreicherung der ß-Glucosidasen in "A" und etwa eine 50-fache in "B" bei einer Gesamtausbeute von ungefähr 80 % jeweils in Relation zum Rohextrakt. Durch eine elektrophoretische Analyse konnten die vereinigten Fraktionen "A", "B" und "C" aus der Gelchromatographie den einzelnen Proteinbanden im Polyacrylamidgel zugeordnet werden (Abb. 30). Dabei zeigte sich, daß in "A" nur eine einzige ß-Glucosidase angereichert war, während "B" und "C" jeweils noch durch die Nachbarbanden verunreinigt waren. Aus diesen Ergebnissen geht eindeutig hervor, daß Cellobionsäure nicht von einem spezifischen Enzym, sondern wie die Cellobiose von Cellobiasen bzw. ß-Glucosidasen hydrolysiert wird.

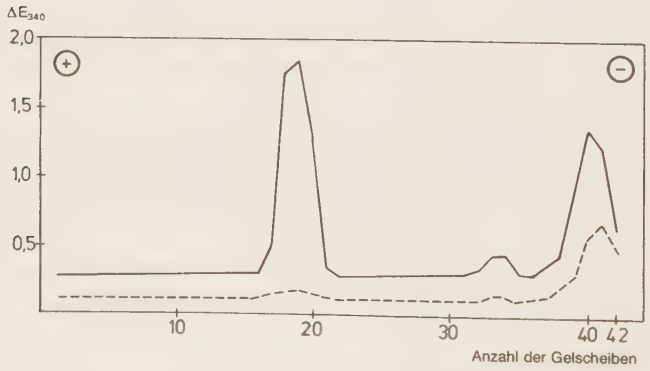



Abb. 30 a:

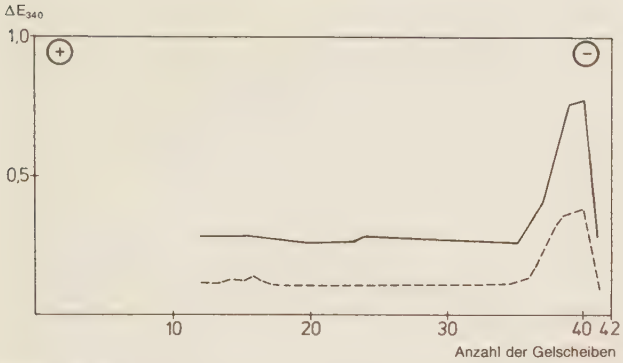



Abb. 30 b:

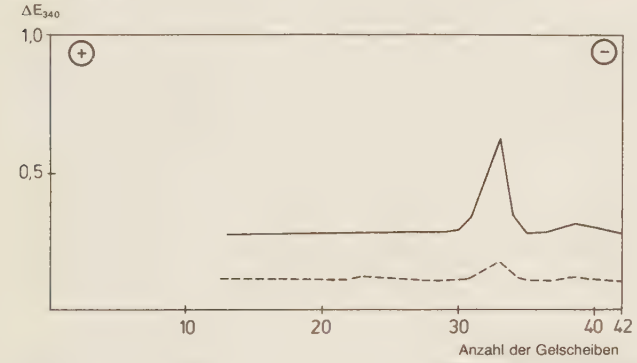



Abb. 30 c:

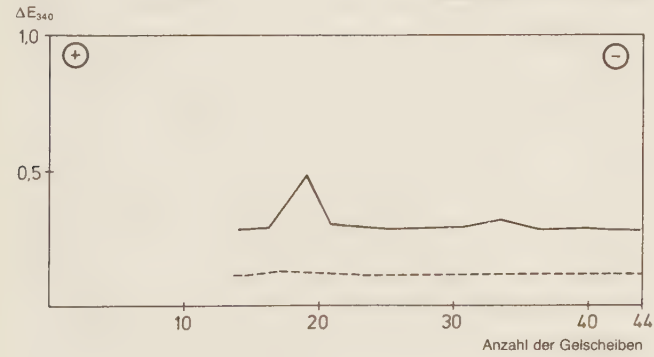



Abb. 30 d:

Abb. 30: Gelelektrophoretische Analyse der in A, B und C vereinigten Fraktionen im alkalischen System, Hydrolyse von Cellobiose (——) und Cellobionsäure (----):
a) Rohextrakt (300 µg Protein)
b) Fraktion A ( 40 µg Protein)
c) Fraktion B (150 µg Protein)
d) Fraktion C (300 µg Protein)

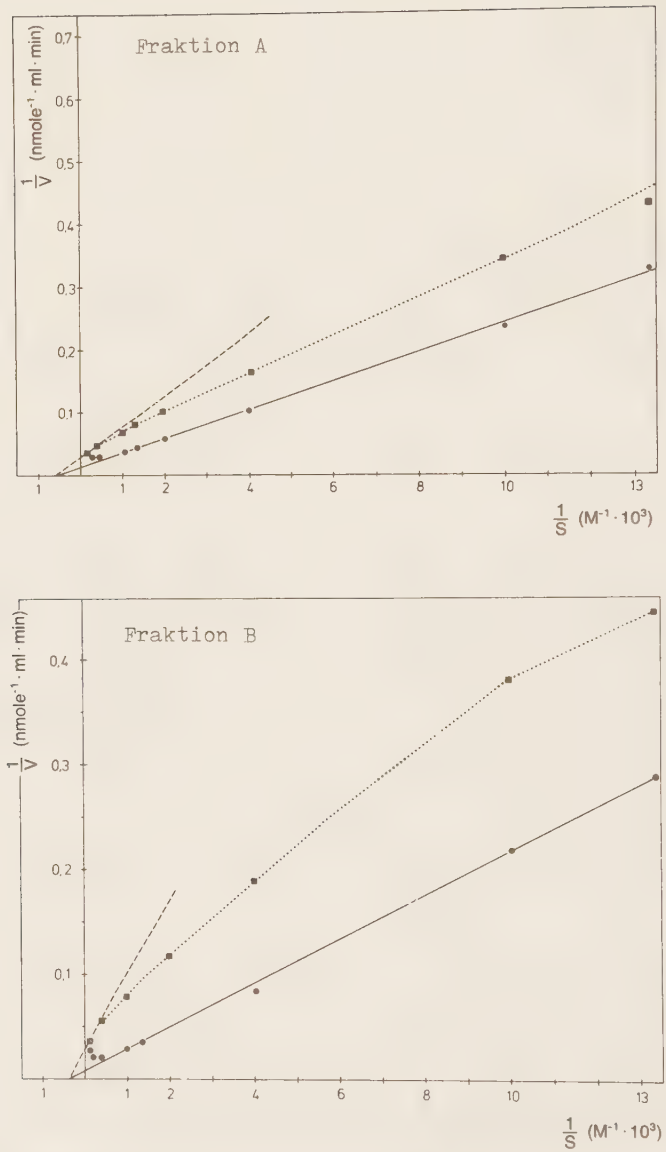



Abb. 31: LINEWEAVER-BURK-Auftragung der ß-Glucosidase-Aktivitäten aus Fraktion A und B gegenüber Cellobiose (———) und Cellobionsäure (-----), (.....); Substratkonzentration: $10^{-5}$ M bis $10^{-2}$ M

Durch Variation der Substratkonzentration im Bereich von $10^{-5}$ M bis $10^{-2}$ M wurden mit den beiden Enzymfraktionen "A" und "B" für Cellobiose und Cellobionsäure die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ($V_{max}$) und der $K_M$-Wert bestimmt. Die Auswertung erfolgte nach LINEWEAVER und BURK (1934; Abb. 31 a, b).

Aus dem Kurvenverlauf der Cellobiosespaltung läßt sich für beide Enzymfraktionen eine Substrathemmung im oberen Wertebereich erkennen. Eine Auswertung der Cellobionsäurespaltung erwies sich als schwierig, weil die LINEWEAVER-BURK-Auftragung keine Gerade ergab. Hierfür ließen sich zwei Erklärungen angeben: Einerseits lag mit Cellobionsäure ($K_i = 6 \times 10^{-3}$ M nach BRUCHMANN und MARKIANOS, 1969), Gluconsäure in der Form des Lactons ($K_i = 10^{-5}$ M bis $10^{-4}$ M nach REESE und MANDELS, 1960) und Glucose ($K_i = 2{,}5$ mM nach GONG et al., 1977 und BRUCHMANN und MARKIANOS, 1969) stets ein Gemisch unterschiedlich starker Inhibitoren vor, deren jeweilige Konzentration ständig verändert wurde. Andererseits war nicht die Cellobionsäure sondern Cellobionolacton das Substrat bei der Hydrolyse von Cellobionsäure. Bei Reaktionsbeginn lag daher zunächst eine geringere Substratkonzentration vor, als gemäß der Einwaage angenommen wurde. Da aber Lacton und Säure im Gleichgewicht stehen, wurde während der Enzymreaktion ständig Lacton nachgebildet. Die Dauer zur Einstellung des Gleichgewichts mit einer Reaktionsrate von 0,1 - 0,5 % pro Minute (nach MOELLER, 1969) dürfte dafür verantwortlich sein, daß niedrigere Reaktionsgeschwindigkeiten als mit Cellobiose erzielt wurden. Um dennoch einen Vergleich der Kinetiken mit Cellobiose und Cellobionsäure zu ermöglichen, wurde entschieden, den $K_M$-Wert für Cellobionsäure durch Anlegen der Tangente im unteren Bereich der Kurve in Annäherung zu ermitteln. Bei einer anderen Lage der Tangente oder bei einer Anpassung an die Meßpunkte wäre der nach LINEWEAVER und BURK ermittelte Wert für $V_{max}$ niedriger als die im oberen Konzentrationsbereich gemessenen Werte für V gewesen. Die $K_M$-Werte entsprechen aber nicht den tatsächlichen Werten für Cellobionsäure; sie deuten lediglich an, daß die $K_M$-Werte für die Hydrolyse von Cellobionsäure bzw. Cellobionolacton im Bereich der $K_M$-Werte für Cellobiose liegen. Die $K_M$-Werte für Cellobiose zeigten mit $1{,}7 \times 10^{-3}$ M für Protein "A" und $2{,}59 \times 10^{-3}$ für Protein "B" gute Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Daten (BERGHEM und PETTERSON,

1974; GONG et al., 1977). Nimmt man gleiche $K_M$-Werte für beide Enzymsubstrate an, wie es in Abb. 31 dargestellt wurde, so kann man erwarten, daß beide auf die gleiche Art umgesetzt werden.

Bei Versuchen mit dem ß-Glucosidase-Hemmstoff Desoxynojirimycin (Abb. 36, REESE et al., 1971) wurden beide Proteine auf beiden Substraten durch diese Substanz kompetitiv gehemmt, wie man aus der Darstellung der Daten nach LINEWEAVER und BURK ableiten kann (Abb. 32). Die nach DIXON (1953) ermittelten Hemmkonstanten $K_i$ lagen jeweils für beide Substrate im gleichen Bereich, $K_i = 6 \times 10^{-6}$ M für Protein "A", $K_i = 6 - 8 \times 10^{-6}$ M für Protein "B" (Abb. 33). Dies läßt die Folgerung zu, daß Cellobiose und Cellobionsäure bei ihrer Hydrolyse an der gleichen Stelle des jeweiligen Enzyms gebunden werden; denn bei einer kompetitiven Hemmung konkurrieren Enzymsubstrat und Inhibitor um das aktive Zentrum des Enzyms.

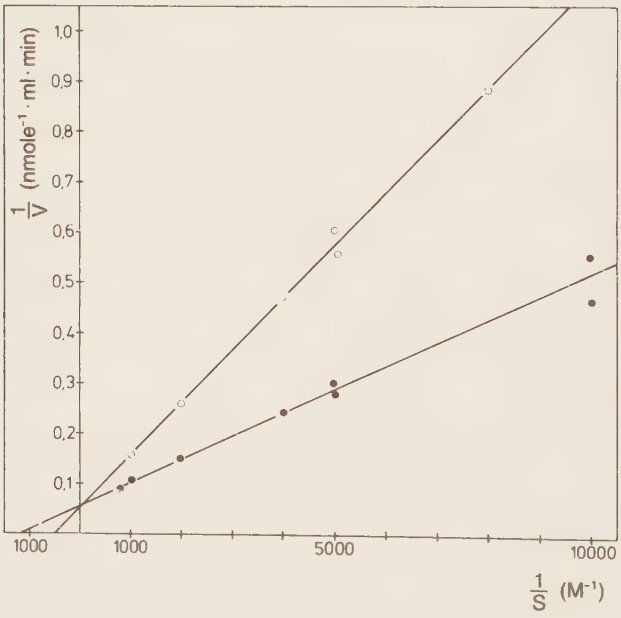



Abb. 32 a:

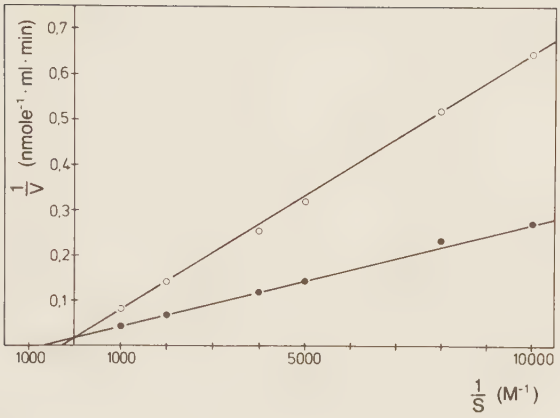



Abb. 32 b:

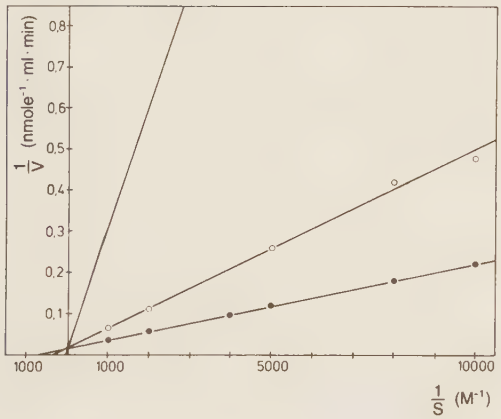



Abb. 32 c:

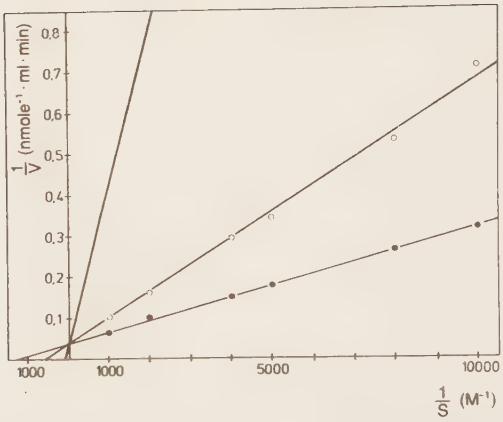



Abb. 32 d:

Abb. 32: LINEWEAVER-BURK-Auftragung der ß-Glucosidase-Aktivitäten in Gegenwart des ß-Glucosidase-Inhibitors Desoxynojirimycin: Hydrolyse von Cellobiose in Fraktion A (a) und B (c) und Cellobionsäure in Fraktion A (b) und B (d); Inhibitorkonzentration: 0 M (●——●), $10^{-5}$ M (o——o), $10^{-4}$ M (———); Substratkonzentration: $10^{-4}$ - $10^{-3}$ M

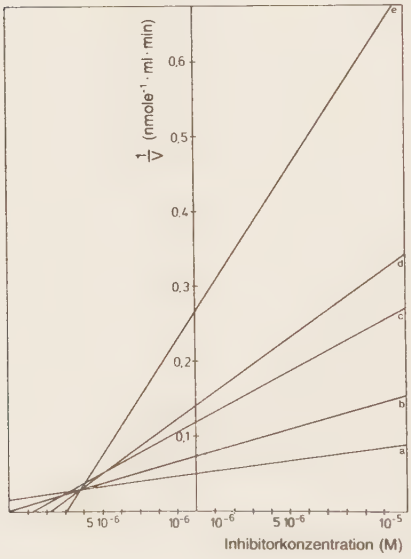



Abb. 33-1:

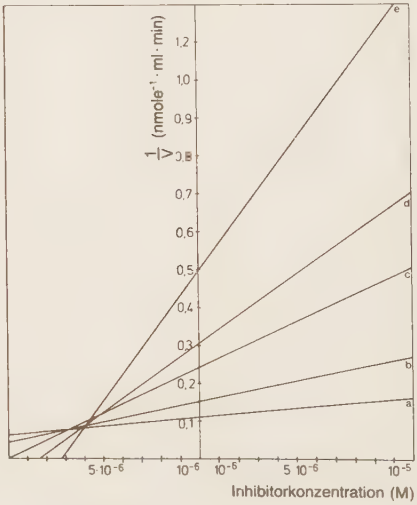
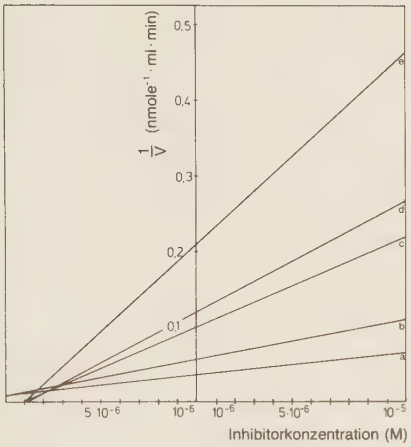



Abb. 33-4:



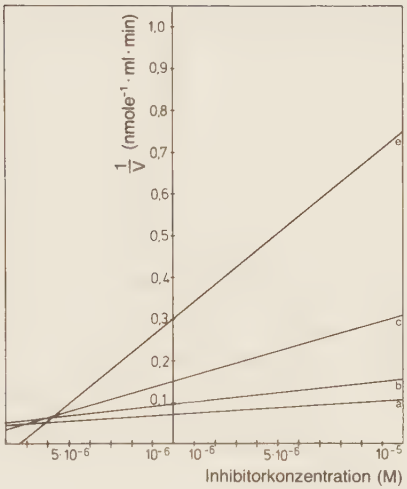




Abb. 33-3: Abb. 33-4:

Abb. 33: DIXON-Auftragung für die ß-Glucosidasen in Gegenwart von Desoxynojirimycin: Hydrolyse von Cellobiose in Fraktion A (1) und B (3) und Cellobionsäure in Fraktion A (2) und B (4); Substratkonzentration: a) $10^{-3}$ M; b) 5 x $10^{-4}$ M; c) 2,5 x $10^{-4}$ M; d) 2 x $10^{-4}$ M; e) $10^{-4}$ M; Inhibitorkonzentration: $10^{-6}$ - $10^{-4}$ M

Um eindeutig zu klären, ob Cellobionsäure durch die vorliegenden ß-Glucosidasen in der gleichen Weise hydrolysiert wurde wie Cellobiose, wurden die Enzyme mit beiden Substraten gleichzeitig inkubiert, wobei verschiedene Substratverhältnisse eingestellt wurden. Die Umsetzung von Cellobionsäure wurde anhand der enzymatischen Gluconsäurebestimmung verfolgt. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Cellobiosespaltung wurde ermittelt, indem die Werte der Glucosefreisetzung um die aus der Hydrolyse von Cellobionsäure resultierende Glucose korrigiert wurden. Abb. 34 zeigt, daß beide Substanzen um das gleiche aktive Zentrum am Enzym konkurrierten; denn beide verursachten eine kompetitive Hemmung der Hydrolyse des jeweils anderen Substrats.

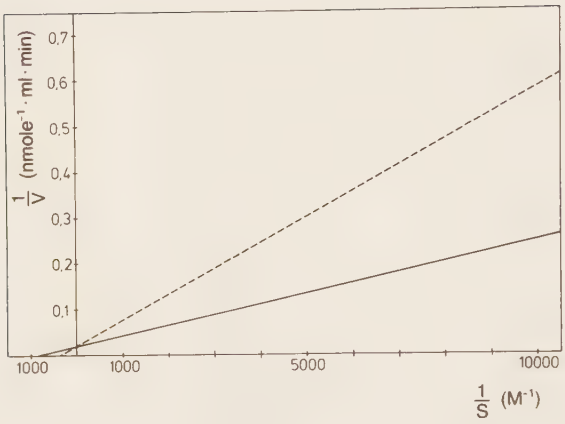



Abb. 34 a:

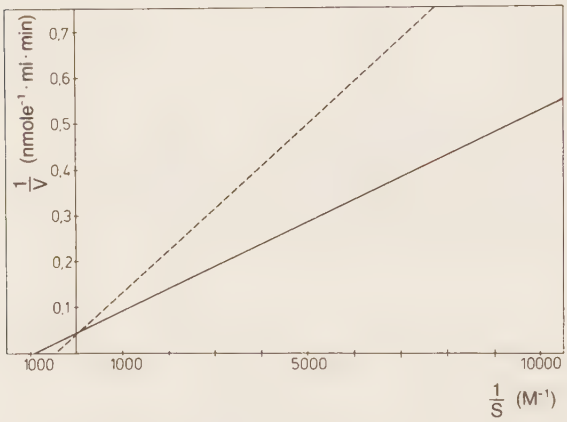



Abb. 34 b:

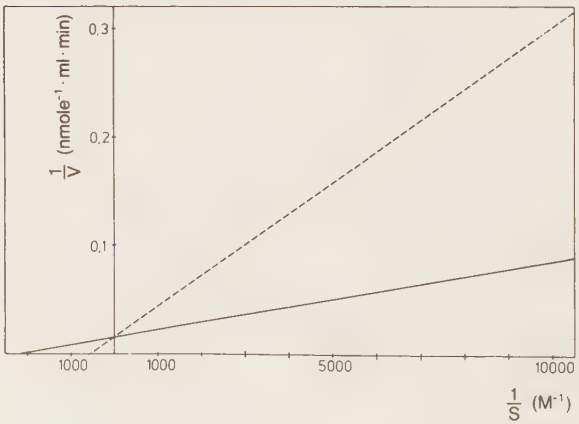



Abb. 34 c:

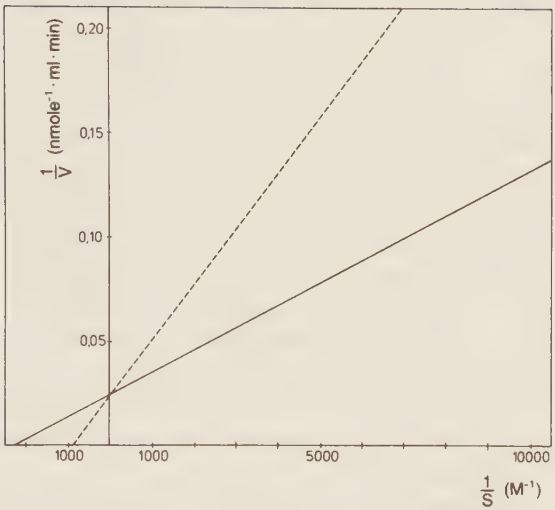



Abb. 34 d:

Abb. 34: LINEWEAVER-BURK-Auftragung der ß-Glucosidase-Aktivitäten unter Konkurrenz von Cellobiose und Cellobionsäure;
a) Fraktion A, Cellobiose als Substrat - Cellobionsäure als Inhibitor
b) Fraktion A, Cellobionsäure als Substrat - Cellobiose als Inhibitor
c) Fraktion B, Cellobiose als Substrat - Cellobionsäure als Inhibitor
d) Fraktion B, Cellobionsäure als Substrat - Cellobiose als Inhibitor
Inhibitorkonzentration: 0 M (——), $10^{-3}$ M (----); getestet wurden $10^{-4}$ M, 2 x $10^{-4}$ M, 5 X $10^{-4}$ M und $10^{-3}$ M; mit zunehmender Inhibitorkonzentration nahm die Hemmung zu; Substratkonzentration: $10^{-4}$ M, 2 x $10^{-4}$ M, 5 x $10^{-4}$ M, $10^{-3}$ M

Aus diesen Ergebnissen geht eindeutig hervor, daß Cellobionsäure im Rohextrakt von *Trichoderma reesei* von den gleichen ß-Glucosidasen hydrolysiert wird wie die Cellobiose. Beide Substanzen werden bei der Umsetzung an der gleichen Stelle am Enzym gebunden.

## 5. Induktion cellulolytischer Enzyme durch synthetische Glucosederivate

Die Veränderung der Grundstruktur von Cellobiose hatte sich nicht als das geeignete Mittel erwiesen, bei der Induktion von Cellulasen durch Disaccharide die Katabolitrepression auszuschalten. Da Thiocellobiose nicht abgebaut wurde, dabei aber auch keine Induktion sondern eher eine Repression der Enzymsynthese bewirkte, kann man sogar vermuten, daß nicht Cellobiose selbst sondern ein Abbauprodukt der Induktor cellulolytischer Enzyme beim Wachstum auf Cellobiose ist. Daher wurde in Anlehnung an die Ergebnisse von J. MONOD (1956) mit Isopropyl-thiogalactosid bei der ß-Galactosidase von *E. coli* untersucht, ob durch chemisch veränderte Monomere - vor allem substituierte Glucose - die Katabolitrepression umgangen und brauchbare Cellulasekonzentrationen induziert werden könnten. Da meist nur geringe Mengen dieser Substanzen zur Verfügung standen, konnten lediglich Versuche mit gewaschenen Myzelien durchgeführt werden.

a) Isopropyl-thioglucopyranosid

Mit Isopropyl-thiogalactosid konnte keine Induktion von Cellulasen bewirkt werden, obwohl das Molekül wie Cellulose und ihre niedermolekularen Abkömmlinge eine ß-glucosidische Bindung enthält. Da dies zunächst auf die Unterschiede zwischen Glucose und Galactose zurückgeführt wurde, wurde Isopropyl-thioglucopyranosid (-glucosid) (Abb. 36), das analoge Glucosederivat zu Isopropyl-thiogalactosid, zur Induktion eingesetzt.

Aus Abb. 35 a geht hervor, daß Isopropyl-thioglucosid von *Trichoderma reesei* nicht abgebaut werden kann. Der offensichtliche Konzentrationsanstieg der Substanz ist auf die Freisetzung reduzierender Zucker durch Zell-Lysis zu erklären. Dennoch konnte eine Enzyminduktion gemessen werden, doch erfolgte die Ausscheidung nur sehr langsam und mit relativ geringen Konzentrationen im Bereich von mU/ml. Man muß daher auch in Erwägung ziehen, ob diese Enzymsynthese nicht durch Isopropyl-glucosid, sondern durch freigesetzte Zucker induziert wurde. Die niedrige Enzyminduktion konnte aber nicht auf das Fehlen einer metabolisierbaren Kohlen-

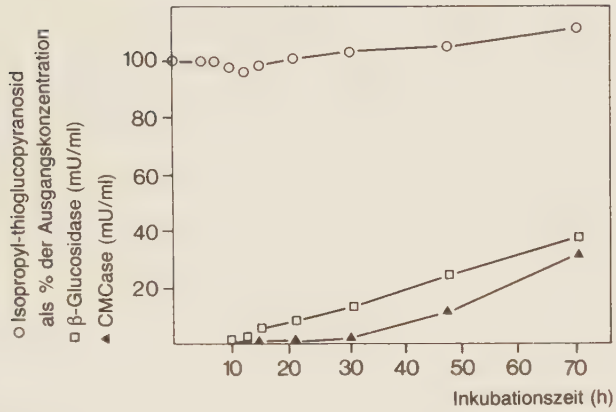



Abb. 35 a:

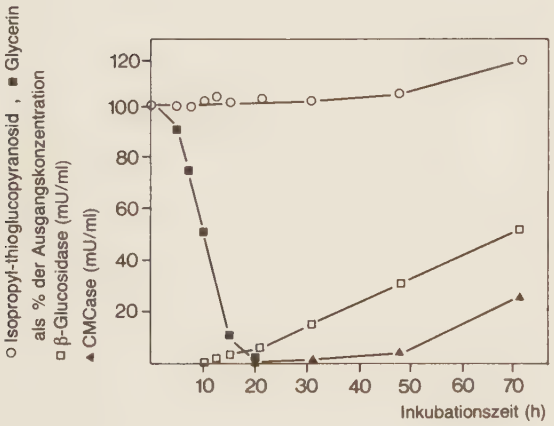



Abb. 35 b:

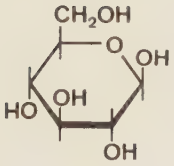
Abb. 35: Induktion cellulolytischer Enzyme (extrazellulär) in gewaschenen Myzelien auf $10^{-2}$ M Isopropyl-thioglucopyranosid ohne (a) und mit (b) Zusatz von 0,2 % Glycerin; bei niedrigeren Induktorkonzentrationen als $10^{-2}$ M war keine Induktion nachweisbar.

stoffquelle zurückgeführt werden, da Abb. 35 b zeigt, daß die Enzymkonzentrationen im wesentlichen unverändert blieben, wenn zu Beginn des Experiments Glycerin zugegeben wurde. Auch wenn sich eine Repression der Enzymbildung durch Glycerin wie auf Cellobiose andeutete, waren die Unterschiede zwischen Abb. 35 a und 35 b nicht signifikant. In beiden Ansätzen erfolgte die Enzymproduktion so langsam, daß eine fortschreitende Lysis der Zellen zu beobachten war, die etwa zur gleichen Zeit einsetzte, wie die Enzymausscheidung. Isopropyl-thioglucosid ist also kein geeigneter Induktor für Cellulasen.

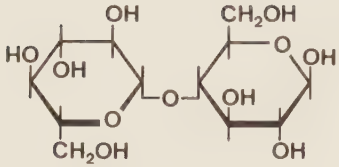
b) Methyl-ß-D-glucopyranosid

Da alle bisher getesteten Thio-Verbindungen zwar nicht oder nur schwer abgebaut werden konnten, aber auch keine Induktion bewirkten, konnte man annehmen, daß die Thio-Gruppierung für die unzureichende Induktion verantwortlich war. Daher wurde in einem weiteren Experiment versucht, diesen Nachteil durch den Einsatz von Methyl-ß-D-glucopyranosid auszuschalten. Durch die Substituierung mit einer Methylgruppe in der $C_1$-Position erhält das Molekül durch die ß-glucosidische Bindung eine Ähnlichkeit mit niedermolekularen Derivaten von Cellulose (Abb. 36). Da die reduzierenden Eigenschaften der Glucose durch die Substituierung verloren gingen, erfolgte die Konzentrationsmessung wie bei Isopropyl-thioglucosid nach der Anthron-Methode.

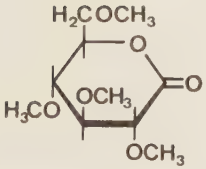
Methyl-ß-D-glucopyranosid wurde nur langsam abgebaut (Abb. 37 a). Bei der Kombination mit Glycerin wurde ein Großteil des Glycerins vor dem Methylglucosid verbraucht (Abb. 37 b), so daß infolge einer auf diese Weise erhöhten Myzelkonzentration der Abbau des zweiten Substrats zunächst ein wenig schneller erfolgte. In beiden Fällen waren nach 96 Stunden noch etwa 10 % der Testsubstanz übrig.



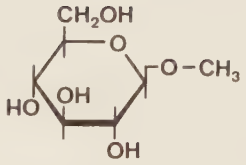
ß-D-Glucose



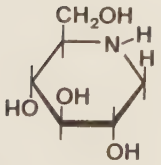
Cellobiose



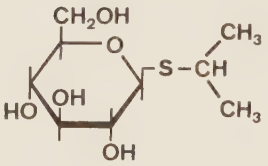
Tetramethylgluconolacton



Methyl-ß-D-Glucopyranosid



Desoxynojirimycin



Isopropyl-ß-D-thioglucopyranosid

Abb. 36: Strukturvergleich von synthetischen Glucosederivaten mit Glucose und Cellobiose; die Wasserstoffatome der Glucose-Reste wurden zur besseren Übersichtlichkeit weggelassen.

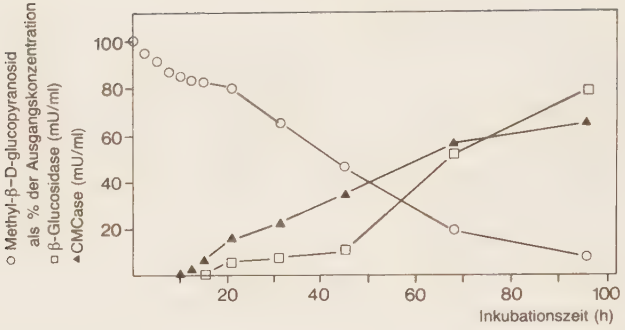



Abb. 37 a:

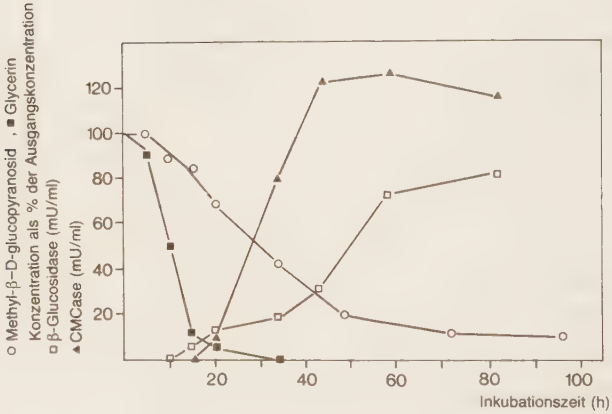



Abb. 37 b:

Abb. 37: Induktion cellulolytischer Enzyme (extrazellulär) in gewaschenen Myzelien auf $10^{-2}$ M Methyl-ß-D-glucopyranosid ohne (a) und mit (b) Zusatz von 0,2 % Glycerin; bei niedrigeren Konzentrationen der Testsubstanz war keine Induktion nachweisbar.

Die cellulolytischen Enzyme wurden durch Methylglucosid schwach induziert, wobei nach 96 Stunden nur etwa 70 - 80 mU/ml für beide gemessen wurden (Abb. 37 a). Eine anfängliche Dosis von 0,2 % Glycerin verursachte eine Verzögerung der CMCase-Produktion von ca. fünf Stunden; dann aber wurde die Enzymaktivität auf ca. 140 mU/ml im Maximum annähernd verdoppelt (Abb. 37 b), während durch die Zugabe des Glycerins nur eine 50 %ige Zunahme der

Myzelkonzentration bewirkt werden konnte. Durch Glycerin wurde also die Synthese des Enzymproteins unterstützt, Methylglucosid allein wurde wohl zu langsam abgebaut, um neben der Erhaltung des Zellstoffwechsels noch eine dem Induktionsimpuls entsprechende Proteinsynthese gewährleisten zu können. Die ß-Glucosidase wurde etwas früher als im Ansatz ohne Glycerin ausgeschieden, doch wurde hier die Enzymproduktion nicht verbessert. In diesem Experiment waren also die gleichen Anzeichen der Katabolitrepression zu erkennen wie in den Versuchen mit anderen Testsubstanzen.

Mit der $\alpha$-Form dieses Glucosederivats konnten nur Spuren an Enzym, u.U. infolge einer Verunreinigung durch die ß-Form, erzielt werden. Da MANDELS und REESE (1957) mit Maltose ebenfalls keine Cellulasen induzieren konnten, muß man davon ausgehen, daß zur Induktion von Cellulasen eine ß-glucosidische Verbindung notwendig ist.

c) Tetramethyl-D-gluconolacton (Abb. 36)
Eine andere Form synthetischer Induktoren wurde in einer Arbeit von BRUCHMANN et al. (1978) getestet, wobei die Induktion von Cellulasen durch Lactone an einem nicht näher beschriebenen Stamm von *Trichoderma viride (reesei)* untersucht wurde.

Nachdem Gluconolacton in allen Versuchen ohne Wirkung geblieben war, zeigte auch Tetramethyl-D-gluconolacton allein keine induktive Wirkung, wobei die Substanz jedoch nur schwer abgebaut werden konnte. Wenn Glycerin aber als metabolisierbare Kohlenstoffquelle zur Unterstützung der Proteinsynthese hinzugegeben wurde, stieg die Konzentration an ß-Glucosidasen rasch an, nachdem das Glycerin ebenso schnell verbraucht worden war wie in den Kontrollansätzen (Abb. 38), doch erschien das Enzym wesentlich später als auf Cellobiose. Nach ca. 60 Stunden wurde ein Maximum von etwa 100 mU/ml erreicht. CM-Cellulasen waren nur in Spuren von ca. 7 mU/ml nachweisbar. Hierin bestätigt sich das Ergebnis von BRUCHMANN et al. (1978), daß durch Tetramethylgluconolacton nur ein Enzym des cellulolytischen Systems induziert wurde. Bei BRUCHMANN et al. war dies jedoch eine Exo-glucanase.

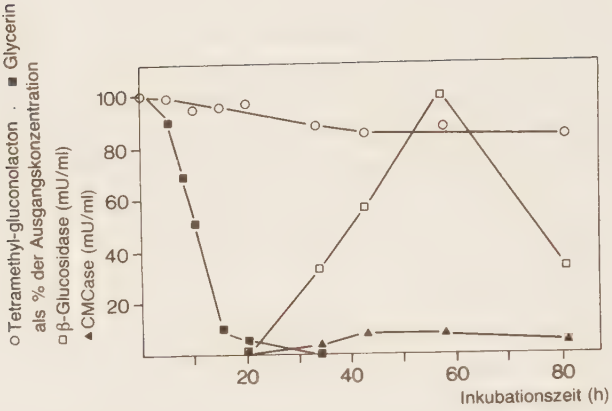



Abb. 38: Induktion cellulolytischer Enzyme (extrazellulär) in gewaschenen Myzelien auf $10^{-2}$ M Tetramethyl-gluconolacton unter Zusatz von 0,2 % Glycerin beim Start; ohne Glycerin war keine Enzymbildung zu beobachten, bei geringeren Induktorkonzentrationen erfolgte auch beim Zusatz von Glycerin keine Induktion

## 6. Induktion durch Disaccharide, die sich nicht von Cellulose ableiten lassen

Mit den verschiedenen synthetischen Zuckerderivaten konnten - noch weniger als mit Cellobiose - die durch Cellulose induzierten Cellulasekonzentrationen erzielt werden. Bessere Enzymkonzentrationen waren mit dem Disaccharid Cellobiose induziert worden. Deshalb wurde noch einmal die Induktion durch andere, nicht von Cellulose abzuleitende Disaccharide untersucht, die sich in anderen Stämmen von *Trichoderma reesei* als mehr oder weniger gute Induktoren bewährt hatten. Entscheidend dafür war, daß die beschriebenen Versuchsanordnungen mit diesen Substanzen z.T. noch nicht durchgeführt worden waren.

a) Lactose

Lactose wurde ausgewählt, weil sie nach MANDELS und REESE (1960) zwar nur ein langsames Wachstum von *Trichoderma reesei* (Stamm nicht näher beschrieben) gewährte, aber ein besserer Cellulase-Induktor als Cellobiose war. Im Schüttelkolben wurde Lactose um etwa 50 % langsamer als Cellobiose - d.h. in drei statt in zwei Tagen - abgebaut. Die Cellulaseproduktion lag mit 0,6 U/ml auf Lactose jedoch deutlich höher als auf Cellobiose (Abb. 39). Auch die ß-Glucosidase erreichte mit ca. 140 mU/ml höhere Werte als auf Cellobiose.

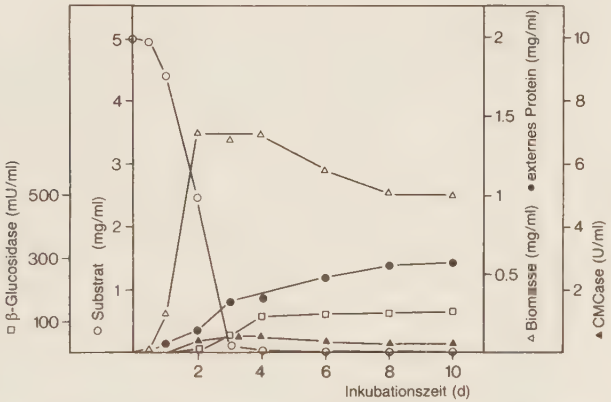



Abb. 39: Wachstum und Synthese extrazellulärer, cellulolytischer Enzyme auf 0,5 % Lactose

Eine weitere Steigerung der Enzymproduktion konnte in den Versuchen mit gewaschenen Myzelien beobachtet werden. Obwohl die Substratkonzentration von 0,5 % auf ca. 0,35 % (= $10^{-2}$ M) gesenkt wurde, konnte die Cellulaseaktivität auf 2 U/ml verbessert werden (Abb. 40). Die Konzentration der ß-Glucosidase wurde jedoch nicht erhöht. Wenn Glycerin zusammen mit Lactose inkubiert wurde, wurde es der Lactose als Kohlenstoff- und Energiequelle vorgezogen (Abb. 40 b). Diese Verzögerung der Lactoseaufnahme ist wohl als Grund für die verzögerte Enzymsynthese auf Glycerin und Lactose anzuführen, doch wurde die Bildung der Cellulasen länger verzögert als die der ß-Glucosidase. Das

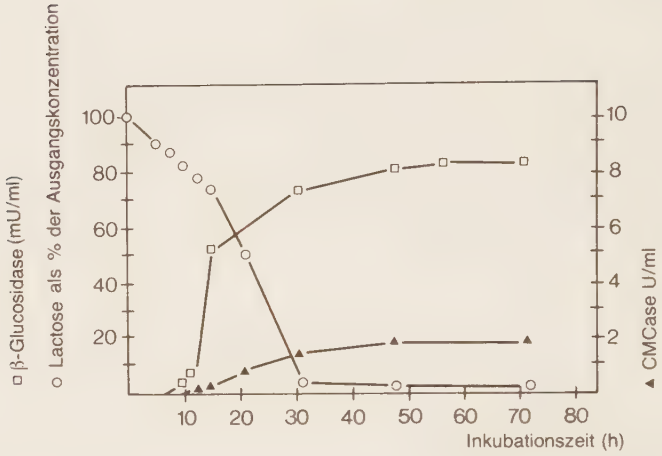



Abb. 40 a:

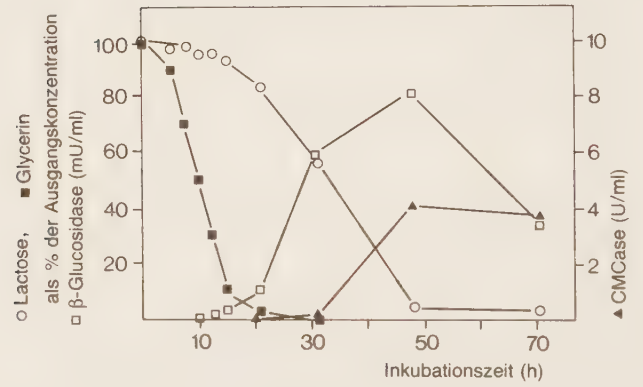



Abb. 40 b:

Abb. 40: Induktion cellulolytischer Enzyme (extrazellulär in gewaschenen Myzelien auf $10^{-2}$ M Lactose ohne (a) und mit (b) Zusatz von 0,2 % Glycerin; maximale CMCase-Aktivitäten bei niedrigen Substratkonzentrationen = 0 ($10^{-6}$ M), 15 mU/ml ($10^{-5}$ M), 250 mU/ml ($10^{-4}$ M), 800 mU/ml ($10^{-3}$ M); = b) 0 ($10^{-6}$ M), 20 mU/ml ($10^{-5}$ M), 210 mU/ml ($10^{-4}$ M), 890 mU/ml ($10^{-3}$ M); die Synthese von ß-Glucosidasen zeigte eine ähnliche Abhängigkeit von der Induktorkonzentration

Wachstum auf der Kombination von Lactose und Glycerin resultierte in der Ausscheidung von ca. 4 u/ml an CMCase. Diese Steigerung war nicht allein auf die Zunahme der Biomasse im Ansatz durch Wachstum auf Glycerin zurückzuführen, da diese im Gegensatz zur Cellulaseaktivität nicht verdoppelt werden konnte. Die Konzentration der ß-Glucosidase wurde nicht verändert, was wohl wie auch bei anderen Versuchen auf verschiedenartigen Regulationsmechanismen für beide Enzyme basierte.

Wie auch schon mit Cellobiose und Cellobionsäure konnte die Synthese cellulolytischer Enzyme auf Lactose in kontinuierlichen Kulturen gegenüber einfachen Schüttelkulturen stark verbessert werden (Abb. 41). Die Enzymausbeute der Versuche mit gewaschenen Myzelien wurde aber mit 3,8 U/ml der Cellulasen in der kontinuierlichen Kultur auf 0,5 % Lactose nicht übertroffen. Die Enzymkonzentration zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Durchflußrate, indem die Enzymaktivitäten im Kulturfiltrat mit abnehmender Verdünnungsrate zunahmen. Das Maximum wurde mit D = 0.01 - 0.02 $h^{-1}$ gemessen. Diese Abhängigkeit muß darauf zurückgeführt werden, daß durch die langsamere Substratzufuhr die Katabolitrepression ausgeschaltet wurde.

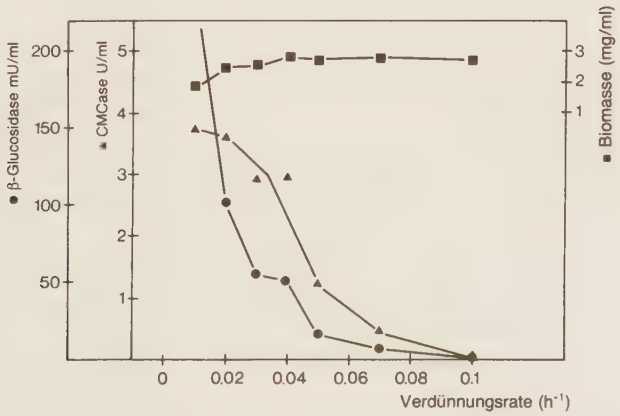



Abb. 41: Kontinuierliche Kultur auf 0,5 % Lactose, die Enzyme wurden im Kulturfiltrat gemessen.

Die starke Zunahme der ß-Glucosidasen bei niedrigen Durchflußraten entsprach wohl der Freisetzung durch Zell-Lysis, wie sie bei anderen Versuchen nach Erreichen der stationären Phase erfolgte. Diese Folgerung ergab sich aus der Abnahme der Myzelkonzentration in diesem Bereich. Kontinuierliche Versuche mit Lactose wurden in der Literatur noch nicht beschrieben, doch entsprach die Abhängigkeit der Enzymproduktion von der Durchflußrate den Beobachtungen von SHIN et al. (1978) mit Cellobiose.

b) Sophorose (2-o-ß-Glucopyranosyl-D-glucose)
Nach MANDELS et al. (1962) und STERNBERG und MANDELS (1979) gilt Sophorose als der beste künstliche Induktor von Cellulasen. Nachdem ihre Wirkung schon in Schüttelkulturen und mit gewaschenen Myzelien untersucht worden war, sollten die Versuche mit gewaschenen Myzelien hier zu Vergleichszwecken wiederholt und außerdem unter Zusatz von Glycerin durchgeführt werden.

Wie zu erwarten war, erwies sich Sophorose als der beste Induktor für Cellulasen, nicht aber für ß-Glucosidasen (Abb. 42).

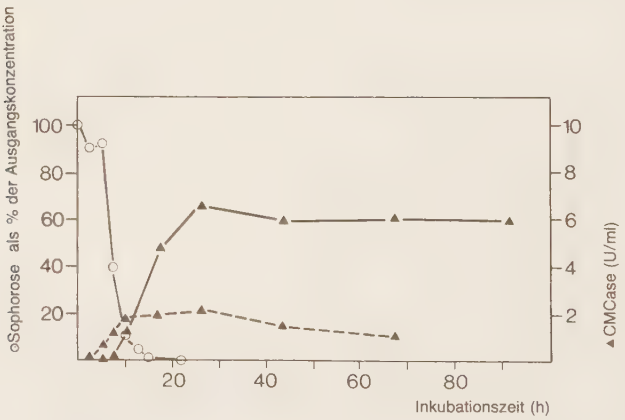



Abb. 42 a:

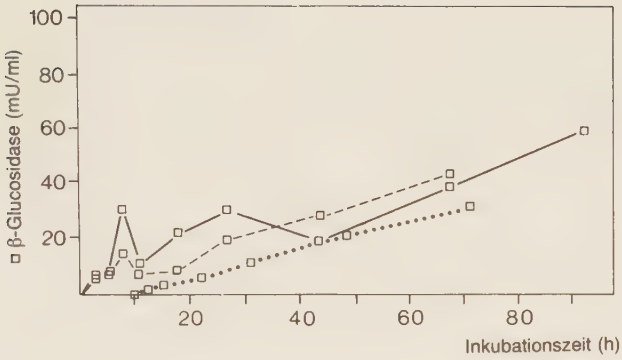



Abb. 42 b:

Abb. 42: Induktion cellulolytischer Enzyme (extrazellulär) in gewaschenen Myzelien auf Sophorose; a) CMCase, b) ß-Glucosidase; 0 M (.....), $10^{-2}$M (——), $10^{-3}$M (----); max. CMCase-Aktivitäten: 0 ($10^{-6}$M), 43 mU/ml ($10^{-5}$M), 0,92 U/ml ($10^{-4}$ M), 2,2 U/ml ($10^{-3}$ M), 6,06 U/ml ($10^{-2}$ M); die Induktion von ß-Glucosidasen war in ähnlicher Weise von der Induktorkonzentration abhängig

Es wurden CMCase-Konzentrationen von ca. 6 U/ml erzielt, wobei die Ausscheidung schon deutlich zunahm, während die Sophorose noch abgebaut wurde. Mit einer Kombination aus Sophorose und Glycerin wurde sogar ein Niveau von 11 U/ml CMCase eingestellt (Abb. 43). Diese Werte entsprechen denen, die auf Cellulose gewonnen wurden, wenn diese in etwa gleichen Substratkonzentrationen angeboten wurde. Das Glycerin wurde erst nach dem Verbrauch der Sophorose abgebaut, doch unterdrückte die Anwesenheit des Glycerins nicht die Cellulasebildung. Die Synthese der ß-Glucosidase aber wurde wie in anderen Experimenten mit Glycerin zu niedrigeren Werten reprimiert (Abb. 42 b, Abb. 43 b). Die Induktion mit Sophorose erfolgte zum gleichen Zeitpunkt wie mit Cellobiose, während mit allen anderen Substanzen ausgenommen Cellobionsäure deutliche Unterschiede auftraten.

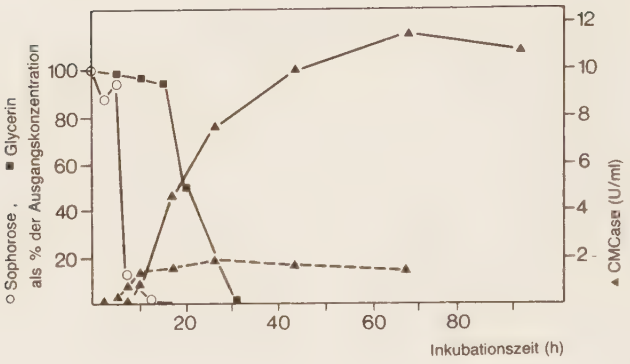



Abb. 43 a:

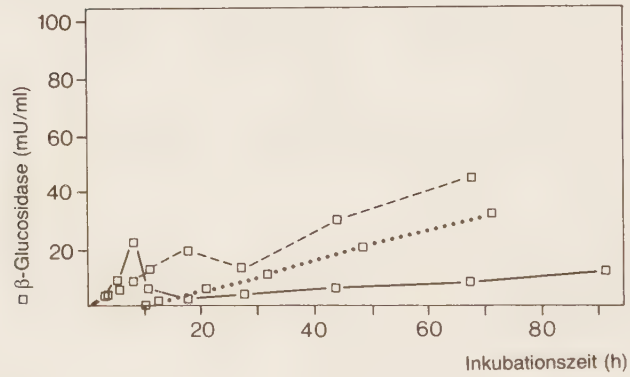



Abb. 43 b:

Abb. 43: Induktion cellulolytischer Enzyme (extrazellulär) in gewaschenen Myzelien auf Sophorose unter Zusatz von 0,2 % Glycerin; a) CMCase, b) ß-Glucosidase; Sophorosekonzentration: $10^{-2}$ M (———), $10^{-3}$ M (-----), 0 = Kontrolle (.....); maximale CMCase-Aktivitäten: 0 ($10^{-6}$ M), 13 mU/ml ($10^{-5}$ M), 61 mU/ml ($10^{-4}$ M), 1,8 U/ml ($10^{-3}$ M), 11,6 U/ml ($10^{-2}$ M); die Induktion von ß-Glucosidasen war in ähnlicher Weise von der Induktorkonzentration abhängig

Der wohl größte Unterschied zwischen Sophorose und anderen Induktoren war die Tatsache, daß die Induktion der CMCase bei einer Konzentration von $10^{-2}$ M später erschien als bei $10^{-3}$ M (Abb. 42, Abb. 43 b). Diese Repression der CMCase durch höhere Sophorosekonzentrationen kann mit deren rascher Hydrolyse durch ß-Glucosidasen (STERNBERG und MANDELS, 1980) erklärt werden.

## IV. DISKUSSION

Cellulolytische Enzyme sind seit langer Zeit als induzierbare Enzyme bekannt (MANDELS und REESE, 1957, 1960; MANDELS et al., 1962; NISIZAWA et al., 1971). Diese allgemeingültige Tatsache wurde durch die vorliegenden Ergebnisse mit *Trichoderma reesei* QM 9414 erneut bestätigt. Dabei stehen auf der einen Seite nicht-induzierende Substrate wie Glycerin und Glucose, die durch den Organismus leicht verwertet werden können, und auf der anderen Seite induzierende Substrate, deren Abbau aufgrund ihrer oligomeren oder polymeren Struktur eine Erweiterung des normalen Enzymmusters erfordert.

Auf den einfachen Kohlenstoffquellen Glycerin und Glucose unterbleibt die Synthese cellulolytischer Enzyme nicht nur durch das Fehlen eines geeigneten Induktors. Es ist vielmehr so, daß diese Metaboliten eine Katabolit-Repression verursachen (NISIZAWA et al., 1971, 1972; BERG und PETTERSON, 1977; CANEVASCINI et al., 1979). Diese Beobachtung wurde auch hier gemacht, wenn Glycerin und ein Induktor gleichzeitig mit gewaschenen Myzelien inkubiert wurden. Dabei werden aber Cellulasen und ß-Glucosidasen nicht in gleicher Weise reprimiert, so daß man unterschiedliche Regulationsmechanismen für diese beiden Enzyme annehmen muß. Eine Abweichung von diesem Verhalten zeigte sich bei den Versuchen mit Sophorose; denn dort wurde nur die ß-Glucosidase nicht aber die Cellulase durch Glycerin reprimiert. In ähnlicher Weise wurden in Versuchen von STERNBERG und MANDELS (1980) Cellulasen durch Sophorose induziert, ß-Glucosidasen aber bei höheren Konzentrationen reprimiert.

Die Enzymsynthese wurde in allen Fällen einer Induktion durch die Anwesenheit von Glycerin deutlich - meist bis zu einer Verdoppelung der Enzymkonzentration - stimuliert. Dies kann man nicht allein auf die durch Wachstum auf Glycerin bedingte Vermehrung der Myzelkonzentration zurückführen; denn wie man aus den Wachstumsversuchen ableiten kann, ist durch den Zusatz von 0,2 % Glycerin eine Verdoppelung der Myzelmasse (2 mg Trockengewicht pro

ml beim Start + Wachstum auf dem ersten Substrat) nicht möglich. Wie der Versuch mit Tetramethyl-gluconolacton zeigt, wird durch Glycerin auch die Proteinsynthese unterstützt.

Auch in nicht induzierten Kulturen können geringe Konzentrationen konstitutiv gebildeter Cellulasen intrazellulär nachgewiesen werden (NISIZAWA et al., 1971 a; STERNBERG, 1975; MANDELS und REESE, 1960; ERIKSSON und HAMP, 1978). Diese Enzyme sind meist an die Zellwand gebunden (NANDA et al., 1981; KUBICEK, 1981). Sie können in alternden Kulturen durch Autolysis freigesetzt werden, wie auch in den obigen Versuchen beobachtet wurde.

Die Existenz konstitutiver Cellulase-Enzyme gilt heute als eine wichtige Grundlage für den Abbau von Cellulose durch Pilze (VAHERI et al., 1979; MANDELS, 1982; NISIZAWA et al., 1971 a, b; RAPP et al., 1981; BISARIA und GHOSE, 1981; RYU und MANDELS, 1980). Nach dieser Vorstellung muß durch die konstitutiven Enzyme zuerst ein lösliches niedermolekulares Produkt aus Cellulose freigesetzt werden, das in die Zelle gelangen kann und dort die Induktion bewirkt. Hierzu ist der direkte Kontakt zwischen Myzel und Cellulose notwendig, der als Adsorption beschrieben wurde (RAPP et al., 1981; BINDER und GHOSE, 1978; BERG, 1978; HERR et. al., 1978). Die Existenz dieses Induktionsprozesses auf Cellulose deutet sich auch bei einem Vergleich der Versuche an, die mit gewaschenen Myzelien durchgeführt wurden. Auf löslichen Substraten, die wie Cellobiose direkt in die Zellen aufgenommen werden können, waren die Enzyme schon nach 2,5 bis 5 Stunden extrazellulär nachweisbar. Dagegen dauerte der Prozeß von Induktorbildung bis zum Auftreten der Enzyme im Medium auf Cellulose fast 15 Stunden.

Die Art der Freisetzung der cellulolytischen Enzyme wird zur Zeit noch diskutiert. So berichteten BERG und PETTERSON (1977), daß in *Trichoderma reesei* der größte Teil der Cellulasen während des aktiven Wachstums auf Cellulose zellgebunden ist und erst nach Verbrauch des Substrats in das Medium entlassen wird. Ähnliche Beobachtungen machten ERIKSSON und HAMP (1978). Sie fanden, daß

die durch Sophorose induzierten Endocellulasen in Trichoderma reesei nicht extrazellulär nachgewiesen werden konnten. Andererseits zeigten STERNBERG und MANDELS (1979), daß in *Trichoderma reesei* QM 6a durch Sophorose induzierte Cellulasen auch nicht mit dem Myzel assoziiert sind, bevor sie in der Kulturflüssigkeit nachweisbar sind, daß also Synthese und Ausscheidung der Enzyme eng miteinander verknüpft sind. Eine aktive Sekretion schon im frühen Kulturstadium von *Trichoderma reesei* QM 9414 fanden auch VAHERI et al. (1979), NANDA et al. (1981) und CHAPMAN und LOEWENBERG (1976). In den vorliegenden Versuchen wurden cellulolytische Enzyme schon während des aktiven Wachstums auf Cellulose ausgeschieden, bevor die Cellulose völlig verbraucht war (vergl. Abb. 15, Abb. 16). Ähnliche Verhältnisse wurden auch auf löslichen Substraten vorgefunden. In Abb. 26 wird ersichtlich, daß CMCasen nach der Synthese sofort in die Kulturflüssigkeit abgegeben wurden. ß-Glucosidasen wurden, wie auch von NANDA et al. (1981) beschrieben, während des Wachstums in den Zellen angereichert und erst nach dem Verbrauch der Cellulose sezerniert.

Durch die Inkubation von Induktoren mit gewaschenen Myzelien konnte die Ausbeute an CM-Cellulasen gegenüber den einfachen Wachstumsversuchen um ca. 40 % erhöht werden. Dies muß man einerseits darauf zurückführen, daß hier schon zu Beginn des Experiments eine Myzelkonzentration von 2 mg Trockengewicht pro ml vorlag, da nach ERIKSSON und HAMP (1978) die Konzentration induzierter Enzyme auch von der Zellkonzentration abhängt. Anderseits wird durch die Inkubation bei pH 3 zwar das Wachstum der Organismen reduziert, doch erfolgt hier eine bessere Synthese von Cellulasen als bei höherem pH (BROWN und HALSTED, 1975; ANDREOTTI et al., 1977; MANDELS und REESE, 1960; BROWN und ZAINUDEN, 1977). Dies ist verständlich, da das pH-Optimum der Cellulasen aus *Trichoderma reesei* bei pH 4,8 liegt (MANDELS, 1982). Da also die Enzymaktivität bei pH 3 stark eingeschränkt ist, muß mehr Enzym gebildet werden, um den gleichen Substratumsatz zu erzielen. Eine Mehrproduktion an Enzymprotein muß dann notwendigerweise auf Kosten des Zellwachstums erfolgen. Die Durchführung der Versuche bei pH 3 könnte aber auch begründen, warum die ß-Glucosidasen meistens mit

niedrigeren Aktivitäten gemessen wurden, als nach den Wachstumsversuchen (bei pH 4-5) in Verbindung mit der Steigerung der Cellulasekonzentration erwartet werden konnte; denn während Cellulasen pH 3 noch ausreichend tolerieren, nimmt die Stabilität der ß-Glucosidasen in diesem Bereich in markanter Weise ab (STERNBERG, 1976).

Die Versuche mit Cellobiose, Cellobionsäure und Lactose zeigen sehr deutlich, daß die besten Induktionsergebnisse mit kontinuierlichen Kulturen erreicht werden können, da hier die Substratzufuhr so langsam erfolgen kann, daß Substrat- und Katabolitrepression ausgeschaltet werden. Infolgedessen wurden die höchsten Enzymkonzentrationen bei niedrigen Durchflußraten nachgewiesen, wo auch das Wachstum reduziert ist - eine Bedingung, die nach HULME und STRANKS (1971) ebenfalls die Cellulaseproduktion fördern kann. Dennoch konnten auf den untersuchten löslichen Induktoren nicht die mit Cellulose im Schüttelkolben erzielten Werte gemessen werden. Doch kann dies nicht nur damit begründet werden, daß diese Substanzen schwächere Induktoren als Cellulose sind, denn durch die hohe Rührerdrehzahl und die Begasung im Fermenter können die Enzymproteine in der Kulturlösung durch Scherkräfte und Oberflächenspannung erheblich geschädigt werden (KIM et al., 1982; REESE und RYU, 1980). Diese Schädigung kann durch den Einsatz von Detergenzien, wie mit Tween 80 im Schüttelkolben praktiziert, eingeschränkt werden (REESE und MAGUIRE, 1971). Außerdem kann durch Detergenzien die Cellulaseproduktion gefördert werden (REESE und MAGUIRE, 1971). Fermenter-Versuche aber sind unter solchen Bedingungen wegen der starken Schaumbildung nicht durchführbar.

In den Versuchen mit gewaschenen Myzelien zeigte sich, daß wohl nur das natürliche Substrat der Cellulasen, die Cellulose, unter diesen Bedingungen eine maximale Enzymausbeute erlaubt. Die Erwartungen, die in die chemische Veränderung niedermolekularer Cellulosederivate gesetzt wurden, konnten in keinem Falle erfüllt werden, wie auch die Cellobiose nach den vorliegenden Ergebnissen

als natürlicher Induktor ausgeschlossen werden kann. Dabei widersprechen die Beobachtungen mit Cellobionsäure den Aussagen von MANDELS et al. (1962) und MANDELS und REESE (1960), daß mit Cellobionsäure in *Trichoderma reesei* keine Cellulasen induziert werden. Lediglich bei *Sporotrichum thermophile* konnte diese Substanz bisher als schwacher Induktor eingesetzt werden. Jedoch deuteten SAAD (1978), BRUCHMANN (1978) und BRUCHMANN et al. (1975, 1978) eine Bedeutung derartiger Substanzen bei der Induktion cellulolytischer Enzyme auch bei *Trichoderma* an. Diese Möglichkeit wurde durch die Existenz von Lacton- und Redukton-Gruppen in Cellulose begründet (BRUCHMANN et al., 1973). In den Versuchen von MANDELS und REESE (1960) und MANDELS et al. (1962) konnte wohl keine Induktion durch Cellobionsäure nachgewiesen werden, weil nur einfache Wachstumsversuche bei pH 5 durchgeführt wurden. Unter solchen Bedingungen wurden allerdings auch hier nur sehr geringe Enzymaktivitäten ($CMCase_{max}$ = 8 mU/ml) gemessen.

Thiocellobiose wirkte bei *Trichoderma reesei* nicht wie bei *Schizophyllum commune* (RHO et al., 1982) als Induktor, sondern als Repressor der Cellulasesynthese. Daraus ist zu schließen, daß in den beiden Organismen unterschiedliche Regulationsmechanismen vorliegen und unterschiedliche Substanzen eine Bedeutung als natürlicher Induktor haben. Ferner wird dadurch angedeutet, daß bei *Trichoderma reesei* die Enzymsynthese auf Cellobiose davon abhängt, daß das Substrat abgebaut werden kann. Die Hydrolyse von Cellobiose ist aber nach dem Austausch des Sauerstoffatoms der glucosidischen Bindung gegen ein Schwefelatom nicht mehr möglich. Wahrscheinlich werden dadurch der Bindungswinkel und die Bindungslänge zu sehr verändert (RUSKE, 1970), um noch eine enzymatische Hydrolyse zuzulassen.

Es ist ganz offensichtlich, daß mit Sophorose - und nach allen bisherigen Untersuchungen (MANDELS, 1982) nur mit Sophorose - in *Trichoderma reesei* ähnlich bzw. gleich hohe Cellulaseaktivitäten wie mit Cellulose induziert werden können. Doch läßt das Versuchssystem mit gewaschenen Myzelien keinen optimalen Vergleich zu, weil hier die Sophorose gleichzeitig als Induktor und als Substrat dient und somit die Induktorkonzentration schnell

abnimmt, während auf Cellulose ständig neue Induktormoleküle gebildet werden. Andererseits war auf hohen Konzentrationen an Sophorose (Anfangskonzentration = $10^{-2}$ M) eine Enzymrepression zu beobachten, bis ein Teil der Sophorose abgebaut war. LOEWENBERG und CHAPMAN (1977) zeigten, daß höhere Enzymkonzentrationen induziert werden, wenn die Sophorose nicht in einer einmaligen Dosis beim Start, sondern über die Inkubationsdauer verteilt in mehreren Schritten zugegeben wird. Dies läßt eine maximale Cellulaseproduktion in kontinuierlichen Versuchen mit Sophorose erwarten.

Durch Sophorose werden aber nach STERNBERG und MANDELS (1979) bei *Trichoderma reesei* QM 6a nicht alle cellulolytischen Enzyme induziert, die auf Cellulose nachgewiesen werden können. Beim gleichen Organismus wurde auch eine Repression der zellgebundenen ß-Glucosidasen durch Sophorose beschrieben (STERNBERG und MANDELS, 1980). Diese Befunde wurden hier insofern bestätigt, als durch Sophorose zwar sehr hohe Cellulaseaktivitäten (10 - 12 U/ml) aber nur sehr geringe Werte für ß-Glucosidasen (ca. 30 mU/ml) gefunden wurden. Jedoch wurde auch von NISIZAWA et al. (1971 a) die Induktion von ß-Glucosidasen durch Sophorose in *Trichoderma viride* (nicht näher bezeichnet) beschrieben.

Eine große Diskrepanz zu den bekannten Ergebnissen mit Sophorose besteht darin, daß die Abhängigkeit der Enzymbildung von der Substratkonzentration nicht wie bei NISIZAWA et al. (1971 a) eine Optimumskurve ergab. Die Enzymkonzentration nahm vielmehr bei einem Testbereich von $10^{-7}$ M bis $10^{-2}$ M Sophorose beginnend bei $10^{-5}$ M mit der Substratkonzentration zu. NISIZAWA et al. (1971, 1972) aber hatten ebenso wie STERNBERG und MANDELS (1979) $10^{-3}$ M als optimale Konzentration beschrieben. Die Ursache ist wohl die hier beobachtete Repression von Cellulasen auf höheren Sophorosekonzentrationen im Anfangsstadium der Inkubation. Die o.g. Autoren aber haben die Abhängigkeit der Enzymbildung von der Substratkonzentration zu einem Zeitpunkt verglichen, zu dem nach ihrer eigenen Aussage die Kulturen gerade in die exponentielle Wachstumsphase übergegangen waren und auf höheren Sophorosekon-

zentrationen in den vorliegenden Versuchen die Enzymsynthese noch reprimiert war. Der eigentliche Repressor ist dabei wohl Glucose, weil Sophorose durch ß-Glucosidasen gut hydrolysiert wird ($K_M$ = 2 x $10^{-3}$ M; STERNBERG und MANDELS, 1980). In der gleichen Weise wird auch auf höheren Cellobiosekonzentrationen (oberhalb 15 mM; WAGNER und SISTIG, 1979) die Enzymsynthese reprimiert.

Aus den vorliegenden Ergebnissen ist zu schließen, daß Sophorose der bzw. ein natürlicher oder zumindest ein direkter Induktor von Cellulasen bei *Trichoderma reesei* ist. Hierfür spricht außer den Cellulasekonzentrationen, daß der Induktionszeitpunkt durch Glycerin nicht verändert wird. Es erhebt sich jedoch die Frage, ob und wie die Sophorose beim Wachstum auf Cellulose gebildet wird, wenn sie ein natürlicher Induktor ist. Die Antwort fanden VAHERI et al. (1979). Sie stellten fest, daß Sophorose wie auch Gentibiose (Glucosyl-ß-1,6-glucose) und Laminaribiose (Glucosyl-ß-1,3-glucose) auf Cellobiose und Cellulose durch Transglycosylierungsreaktionen entstehen, die durch zellgebundene und extrazelluläre ß-Glucosidasen und Cellulasen von *Trichoderma reesei* katalysiert werden. Die Theorie, daß Sophorose der natürliche Induktor ist, wird durch die Beobachtung unterstützt, daß Thiocellobiose keine Cellulasen induziert; denn indem Thiocellobiose nicht hydrolysiert werden kann, kann auch keine Transglycosylierung stattfinden.

Die Ergebnisse von STERNBERG und MANDELS (1979) führen jedoch zu der Annahme, daß Sophorose nicht der einzige natürliche Induktor ist, da durch Sophorose nicht alle Enzyme induziert werden, die auf Cellulose nachgewiesen werden können. So erwies sich Sophorose auch in den vorliegenden Versuchen nur als schwacher Induktor von ß-Glucosidasen. Es besteht also auch die Möglichkeit, daß neben der Sophorose noch andere oligomere Abbau- und Transglycosylierungsprodukte aus Cellulose als Induktoren - u.U. für jeweils andere Enzyme - fungieren, so daß ein vollständiges Cellulasesystem, wie es auf Cellulose synthetisiert wird, von mehreren Induktoren gleichzeitig induziert werden muß. Diese Meinung vertreten auch STERNBERG und MANDELS (1979). Ein Indiz hierfür ist auch, daß Sophorose bei den meisten cellulolytischen Organis-

men keine Induktion von Cellulasen bewirkt und auch nicht bei allen Stämmen von *Trichoderma reesei* erfolgreich eingesetzt werden kann (MANDELS, 1982; MANDELS et al., 1962).

Generell scheinen Abbaubarkeit des Substrats und Transglycosylierungsreaktionen wichtige Voraussetzungen für die Induktion von cellulolytischen Enzymen zu sein, wie auch die Versuche mit Thiocellobiose bekunden. Ferner zeigen die vorliegenden Ergebnisse, daß auch andere schlecht abbaubare Substanzen schwache Induktoren sind.

Ein weiterer bedeutender Gesichtspunkt zum enzymatischen Abbau von Cellulose ergibt sich aus der Beobachtung, daß Cellobionsäure ebenso rasch abgebaut wird wie Cellobiose (vergl. Abb. 18 und Abb. 22). Denn Cellobionsäure tritt einerseits bei der enzymatischen Hydrolyse von Cellulose als Produkt auf, weil diese ca. 0,28 % Carboxylgruppen enthält (BRUCHMANN et al., 1973; WESTERMARK und ERIKSSON, 1975; SCHMIDT et al., 1931/1932; SCHMIDT, 1965). Andererseits kann sie bei cellulolytischen Organismen durch die Oxidation von Cellobiose entstehen (AYERS et al., 1978; ERIKSSON et al., 1974; VAHERI et al., z.Zt in Vorbereitung). Cellobionsäure aber konnte in bisherigen Untersuchungen mit verschiedenen ß-Glucosidasen aus Mandeln (BRUCHMANN und MARKIANOS, 1969), aus *Sporotrichum thermophile* (CANEVASCINI und MEYER, 1979) und aus Rumen-Organismen von Schafen (CONCHIE, 1954; CONCHIE und LEVVY, 1956) nicht enzymatisch hydrolysiert werden. Die Ursache sahen die Autoren in der Inhibition der Enzyme durch das Substrat und das Produkt.

Bei *Trichoderma reesei* aber wird Cellobionsäure in Glucose und Gluconsäure gespalten. Es konnte gezeigt werden, daß die Cellobionsäure durch ß-Glucosidasen hydrolysiert wird, wobei offenbar Cellobionolacton das eigentliche Substrat ist. Die Fähigkeit von ß-Glucosidasen, unspezifisch ein breites Spektrum an ß-glycosidisch verknüpften Oligosacchariden umsetzen zu können, ist nach SHEWALE (1982) bekannt. Die Existenz eines spezifischen Enzyms für die Spaltung von Cellobionsäure oder die Mitwirkung von Hilfsenzymen wie Lactonasen konnten nicht bestätigt werden, wie auch REESE und MANDELS (1960) bei *Trichoderma reesei* keine Lactonase finden konnten.

Auch bei *Aspergillus niger* wird Cellobionsäure durch ß-Glucosidasen hydrolysiert (BRUCHMANN und MARKIANOS, 1969; MOELLER, 1973). Doch ist dazu die Wirkung von Lactonasen auf Gluconolacton erforderlich, da die ß-Glucosidasen von *Aspergillus niger* durch dieses Produkt ($K_i$ = 7 x $10^{-4}$ M) inhibiert werden, das mit der freigesetzten Gluconsäure im Gleichgewicht steht. Da Cellobionsäure ebenfalls mit ihrer Lactonform im Gleichgewicht steht, das Lacton aber nach MOELLER (1973) durch Lactonasen hydrolysiert wird, wird bei *Aspergillus niger* Cellobionsäure selbst als Substrat angenommen. Aber auch bei diesem Organismus muß die Mitwirkung einer Lactonase bei der enzymatischen Cellobionsäurespaltung nicht unbedingt erforderlich sein. BRUCHMANN und MARKIANOS (1969) zeigten zwar mit frisch in Lösung gebrachtem Gluconolacton, daß dessen auch spontan erfolgende Hydrolyse durch Enzyme des Rohextrakts beschleunigt wird; doch wirkt ein Enzym bekanntlich auch nur bis zur Einstellung des Gleichgewichts. Daher kann die Lactonkonzentration nur von der Reaktionsgeschwindigkeit der Cellobionsäurespaltung nicht aber durch die Wirkung einer Lactonase bestimmt werden. Da aber BRUCHMANN und MARKIANOS (1969) und MOELLER (1973) zeigen konnten, daß die enzymatische Hydrolyse von Cellobionsäure durch eine Lactonase aus dem Rohextrakt von *Aspergillus niger* gesteigert werden konnte, ist zu diskutieren, ob nicht durch die als Lactonasen bezeichneten Enzyme auch noch eine andere Veränderung von Gluconolacton oder auch von Gluconsäure oder Cellobionsäure bewirken und so die Inhibitorkonzentration verringert wird.

Die untersuchten ß-Glucosidasen zeigten bei der Chromatographie an Sephacryl 300 deutliche Unterschiede im Molekulargewicht. Da die Enzymproteine mit einem geringen Elutionsvolumen bzw. mit dem Ausschlußvolumen eluiert wurden, kann man auf ein hohes Molekulargewicht schließen, da bei Sephacryl 300 erst Moleküle ab einem Molekulargewicht von etwa 500000 ausgeschlossen werden. Diese Beobachtungen wurden in Arbeiten mit *Trichoderma reesei* von GONG et al. (1977, MG = 76000 ) und INGLIN et al. (1980, MG = 98000) bestätigt, während extrazelluläre ß-Glucosidasen von *Trichoderma reesei* mit ca. 45000 Dalton ein niedrigeres Molekulargewicht aufweisen (BERGHEM und PETTERSON, 1974). SPREY (persönliche Mitteilung) konnte aus dem Rohextrakt von *Trichoderma*

*reesei* QM 9414 eine ß-Glucosidase isolieren, deren Molekulargewicht mehr als 300000 Dalton betrug. Diese entspricht wahrscheinlich dem Enzym der Fraktion "A" aus der Säulenchromatographie, die im Ausschlußvolumen eluiert wurde. Nach einer Hypothese von INGLIN et al. (1980) sollen die makromolekularen intrazellulären ß-Glucosidasen als Vorstufen für die niedermolekularen extrazellulären Enzyme dienen. Diese Ansicht wird durch die Beobachtung unterstützt, daß intrazellulär früher ß-Glucosidasen nachgewiesen wurden als extrazellulär (vergl. Abb. 26). Die Enzyme wurden offenbar vor der Ausscheidung in den Zellen angereichert.

Durch die enzymatische Hydrolyse von Cellobionsäure kann die Cellulose vollständig abgebaut werden. Ferner wird verhindert, daß sich mit Cellobionsäure ein Inhibitor von ß-Glucosidasen (BRUCHMANN und MARKIANOS, 1969) anreichert, der durch seine Ähnlichkeit mit Cellobiose u.U. auch Exoglucanasen hemmen könnte (MANDELS, 1982).

Aus den vorliegenden Ergebnissen ist bei einem Vergleich mit der Literatur abzuleiten, daß Sophorose ein natürlicher Induktor cellulolytischer Enzyme in *Trichoderma reesei* ist. Dies könnte bewiesen werden, wenn mit Thiosophorose ein der Cellulose ebenbürtiger Induktor synthetisiert wird, der nicht abgebaut werden kann. Hierdurch könnte ausgeschlossen werden, daß auch aus Sophorose der eigentliche Induktor erst gebildet werden muß. Wenn Thiosophorose nicht abgebaut werden kann, aber trotzdem ein starker Induktor ist, ergeben sich zwei entscheidende Vorteile: Es liegt stets eine konstante Induktorkonzentration vor, und die Katabolitrepression auf höheren Konzentrationen ist ausgeschaltet. Dabei ist zu erwarten, daß auch schon geringere Induktorkonzentrationen (unter $10^{-3}$ M) sehr effektiv sind.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Ein künstlicher Induktor für cellulolytische Enzyme, der nicht metabolisiert wird und trotzdem in seiner Wirkung der Cellulose gleichkommt, konnte bisher nicht gefunden werden. Ebenso ist die Frage nach dem natürlichen Induktor und nach dem Induktionsmechanismus noch nicht zufriedendstellend beantwortet. Daher wurden einige synthetische Glucosederivate und verschiedene z.T. derivatisierte Disaccharide bezüglich ihrer induktiven Wirkung auf die Cellulaseproduktion von *Trichoderma reesei* QM 9414 untersucht.

1. Die am besten geeignete Versuchsanordung für die induktive Enzymbildung war die kontinuierliche Fermentation, da auf diese Weise die Probleme der Substrat- oder Katabolitrepression ausgeschaltet werden konnten.

2. Das Ausmaß der Induktion nahm immer mit der Induktorkonzentration zu. Eine zusätzliche Steigerung war in den meisten Fällen durch den Zusatz von Glycerin möglich.

3. Gute Induktion wurde auf Lactose (bis 4 U/ml CMCase bei $10^{-2}$ M + 0,2 % Glycerin und in der kontinuierlichen Kultur mit 0,5 % Lactose) und auf Sophorose (6 U/ml CMCase auf $10^{-2}$ M, 11 U/ml auf $10^{-2}$ M + 0,2 % Glycerin) beobachtet. Auch Cellobiose (2,5 U/ml CMCase auf 0,5 % und 0,2 %) und Cellobionsäure (0,72 U/ml CMCase auf 0,2 %) erbrachten noch relativ gute Enzymkonzentrationen, wenn sie in kontinuierlichen Fermentationen eingesetzt wurden. Allein mit Sophorose wurden etwa gleiche CMCase-Konzentrationen wie mit Cellulose (10 bis 14 U/ml je nach Versuchsanordnung) erzielt. Gute ß-Glucosidase-Aktivitäten wurden nur auf Cellulose (ca. 500 mU/ml in 0,5 % Batch-Kulturen), Cellobiose (ca. 300 mU/ml in kontinuierlicher Fermentation auf 0,2 %) und Cellobionsäure (166 mU/ml in kontinuierlicher Fermentation auf 0,2 %) gefunden.

4. Schwache Induktoren waren Methyl-glucopyranosid, Isopropyl-thioglucopyranosid und auch Cellobiose in Schüttelkulturen; es wurden auch unter Zusatz von Glycerin keine höheren Akti-

vitäten als ca. 150 mU/ml der CMCase gemessen. Mit Cellobionsäure wurden in Batch-Kulturen (auf 0,5 %) 8 mU/ml, im Versuch mit gewaschenen Myzelien aber bis zu 600 mU/ml CMCase (auf $10^{-2}$ M + 0,2 % Glycerin) nachgewiesen. Tetramethylgluconolacton wurde nur schwach abgebaut und induzierte nur bei Zusatz von Glycerin Spuren von CMCase (8 - 10 mU/ml auf $10^{-2}$ M), jedoch relativ hohe ß-Glucosidase-Aktivitäten (ca. 100 mU/ml).

5. Isopropyl-thiogalactopyranosid und Thiocellobiose zeigten keine induktive Wirkung, wurden jedoch auch nicht abgebaut. Thiocellobiose wurde von ß-Glucosidasen nicht hydrolysiert und konnte weder bei CM-Cellulasen noch bei ß-Glucosidasen als Inhibitor fungieren.

6. Durch die Zugabe von Glycerin zu Beginn der Inkubation wurde die Synthese von Cellulasen und ß-Glucosidasen in unterschiedlicher Weise beeinflußt. Die Cellulaseproduktion wurde außer auf Sophorose verzögert, während die Konzentration von ß-Glucosidasen verringert wurde. Man kann also verschiedene Regulationsmechanismen für beide Enzyme annehmen.

7. Die Induktion von Cellulasen durch Sophorose wurde durch Glycerin nicht reprimiert. Sophorose konnte daher als direkter Induktor von Cellulasen bezeichnet werden. Die Synthese von ß-Glucosidasen auf Sophorose wurde jedoch reprimiert.

8. ß-Glucosidasen wurden vor dem Auftreten im Medium zunächst im Myzel konzentriert (ca. 400 mU pro mg Protein im Rohextrakt nach 4 Tagen auf 1 % Cellulose). Die CM-Cellulasen wurden nach der Synthese sofort ausgeschieden.

9. Cellobionsäure wurde im Rohextrakt und im Kulturfiltrat von *Trichoderma reesei* QM 9414 zu Glucose und Gluconsäure hydrolysiert. Im Rohextrakt sind dafür zwei nach Molekulargewicht und $K_M$-Werten ($K_M$ = 1,7 mmol/l; $K_M$ = 2,6 mmol/l für Cellobiose) verschiedene ß-Glucosidasen verantwortlich. Es wurden gleiche oder zumindest ähnliche $K_M$-Werte für Cellobiose und Cellobion-

säure gefunden. Beide Substrate konkurrierten um die gleiche Bindungsstelle am jeweiligen Enzym, denn jedes trat als kompetitiver Inhibitor bei der Hydrolyse des anderen auf. Ein für Cellobionsäure spezifisches Enzym oder die Beteiligung einer Lactonase wie bei *Aspergillus niger* konnten nicht nachgewiesen werden. Nach den vorliegenden Befunden war offenbar Cellobionolacton das tatsächliche Substrat bei der enzymatischen Spaltung der Cellobionsäure.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Almin, K.E.; Eriksson, K.E.; Pettersson, B. (1975): Extracellular Enzyme System Utilized by the Fungus *Sporotrichum pulverulentum (Chrysosporium lignorum)* for the Breakdown of Cellulose. European Journal of Biochemistry 51, 207-211

Andreotti, R.E.; Mandels, M.; Roche, C. (1977): Effect of some Fermentation Variables on Growth and Cellulase Production by *Trichoderma* QM 9414. Proc. Bioconversion Symp. II Dehli 249-267

Augustin, J.; Zemek, I.; Kuniak, L.; Fassatiova, O. (1981): Production of ß-Glucosidase, Exo-ß-1,4-glucanase and Endo-ß-1,4-glucanase by Selected Microscopic Fungi. Folia Microbiol. 26, 14-19

Ayers, A.R.; Ayers, S.B.; Eriksson, K.E. (1978): Cellobiose Oxidase, Purification and Partial Characterization of a Hemoprotein from *Sporotrichum pulverulentum*. Eur. J. Biochem. 90, 171-181

Banauch, D.; Brümmer, W.; Ebeling, W.; Metz, H.; Rindfrey, H.; Lang, H.; Leybold, K.; Rick, W. (1975): Eine Glucosedehydrogenase für die Glucose-Bestimmung in Körperflüssigkeiten. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13, 101-107

Berg, B. (1978): Cellulosedegradation and Cellulase Formation by *Phialophora malorum*. Arch. Microbiol. 118, 61-65

Berg, B.; Pettersson, G. (1977): Location and Formation of Cellulases in *Trichoderma reesei*. Journal of Applied Bacteriology, London 42, 65-75

Berghem, L.E.R.; Pettersson, L.G. (1974): The Mechanism of Enzymatic Cellulose Degradation: Isolation and some Properties of a ß-Glucosidase from *Trichoderma viride*. Eur. J. Biochem. 46, 295-305

Binder, A.; Ghose, T.K. (1978): Adsorption of Cellulose by *Trichoderma viride*. Biotechnology and Bioengineering 20, 1187-1199

Bisaria, V.S.; Ghose, T.K. (1981): Biodegradation of cellulosic Materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. Enyzme Microb. Technol. 3, 90-104

Bradford, M.M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Using the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254

Brown, D.E.; Halsted, D.J. (1975): The Effect of Acid pH on the Growth Kinetics of *Trichoderma viride*. Biotechnology and Bioengineering 17, 1199-1210

Brown, D.E.; Zainudeen, M.A. (1977): Growth Kinetics and Cellulase Biosynthesis in the Continuous Culture of *Trichoderma viride*. Biotechnology and Bioengineering 19, 941-658

Bruchmann, E.E. (1970): Zur Biochemie und Biotechnologie der Cellobionsäure. Symposium Technische Mikrobiologie Ber.2 Berlin, Ed.: Dellweg, H., Band 2, 359-366

Bruchmann, E.E. (1978): Lactone, Reduktone und enzymatische Celluloseverzuckerung. Chemikerzeitung 102, 387-389

Bruchmann, E.E.; Betsch, E.; Ghafuri, M.; Knupfer, H.; Lauster, M.; Layer, P.; Schmid, S. (1973): Beitrag zur Kenntnis des Einflusses funktioneller Gruppen in Cellulose auf ihre Spaltbarkeit durch ein mikrobielles Cellulase-System. Symposium Technische Mikrobiologie Ber. 3, Berlin, 533-538

Bruchmann, E.E.; Graf, H.; Saad, A.A.; Schrenk, D. (1978): Zur Gewinnung hochaktiver Cellulasepräparate und Optimierung der enzymatischen Cellulosehydrolyse, II, Chemikerzeitung 102, 154-155

Bruchmann, E.E.; Kirsch, B.; Lauster, M. (1975): Zur Gewinnung hochaktiver Cellulasepräparate und Optimierung der enzymatischen Cellulosehydrolyse, Chemikerzeitung 99, 157-158

Bruchmann, E.E.; Markianos, E. (1969): Über die enzymatische Spaltung der Cellobionsäure. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 554-562

Burgess, J. (1979): Cellulose Microfibrills - an End in Sight? Nature Vol. 278, 212

Canevascini, G.; Condray, M.-R.; Rey, J.P.; Southgate, R.J.G.; Meier, H. (1979): Induction and Catabolite Repression of Cellulase Synthesis in the Thermophilic Fungus *Sporotrichum thermophile*. Journal of General Microbiology 110, 291-303

Canevascini, G.; Meyer, H.P. (1979): ß-Glucosidase in the Cellulolytic Fungus *Sporotrichum thermophile* Apinis. Experimental Mycology 3, 208-214

Chapman, C.M.; Loewenberg, J.R. (1976): Ultracytochemistry of Cellulase Synthesis in the Fungus *Trichoderma*. American Society of Plant Physiologists, Program and Abstracts for the "Annual Meeting Suppl. Plant. Physiol.", Lancaster 57, 70

Conchie, J. (1954): ß-Glucosidase from Rumen Liquor. Biochem. J. 58, 552-560

Conchie, J.; Levvy, G.A. (1957): Inhibition of Glycosidases by Aldolactones of Corresponding Configuration. Biochem. J. 65, 389-395

Condray, M.-R.; Canevascini, G.; Meier, H. (1982): Characterization of a Cellobiose dehydrogenase in the Cellulolytic Fungus *Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile*. Biochem. J. 203, 277-284

Cowling, E.B. (1975): Physical and Chemical Constrains in the Hydrolysis of Cellulose and Lignocellulose Materials. Biotechnol. and Bioeng. Symp. No. 5, Hrsg.: C.R. Wilke, An Interscience Publication, New York , 163-182

Cowling, E.B.; Kirk, T.K. (1976): Properties of Cellulose and Lignocellulosic Materials as Substrate for Enzymatic Conversion Processes. Biotechnol. And Bioeng. Symp. No. 6 Hrsg.: E. Gaden, M. Mandels, E. Reese, L. Spano, An Interscience Publication, New York, 95-124

Dekker, R.F.H. (1980): Induction and Characterization of a Cellobiose Dehydrogenase Produced by a Species of *Monilia*. J. o. General Microbiology 120, 309-316

Di Jeso, F. (1968): Ammonium Sulfate Concentration Conversion Nomograph for 0°C. J. Biol. Chem. 243, 2022-2023

Dixon, M. (1953): A Nomogram for Ammonium Sulphate Solutions. Biochem. J. 54, 457-458

Dixon, M. (1953): The Determination of Enzyme Inhibitor Constants. Biochem. J. 55, 170-171

Domsch, K.H.; Gams, W. (1970): Pilze auf Agarböden. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Enari, T.M.; Markkanen, P. (1977): Production of Cellulolytic Enzymes by Fungi. Adv. Biochem. Eng. 5, 1-8

Eriksson, K.E. (1978): Enzyme Mechanisms Involved in Cellulase Hydrolysis by the Rot Fungus *Sporotrichum pulverulentum*. Biotechnol. Bioeng. Vol. XX, 317-332

Eriksson, K.E.; Hamp, S.G. (1978): Regulation of Endo-1,4-ß-glucanase Production in *Sporotrichum pulverulentum*. Eur. J. Biochemistry 90, 183-190

Eriksson, K.E.; Petterson, B. (1975): Extracellular Enzyme System Utilized by the Fungus *Sporotrichum pulverulentum (Chrysosporium lignorum)* for the Breakdown of Cellulose. 1. Separation, Purification and Physico-Chemical Characterization of Five Endo-1,4-ß-glucanases.Eur. J. Biochem. 51, 193-206

Eriksson, K.E.; Petterson, B. (1975): Extracellular Enzyme System Utilized by the Fungus *Sporotrichum pulverulentum (Chrysosporium lignorum)* for the Breakdown of Cellulose. Eur. J. Biochem. 51, 213-218

Eriksson, K.E.; Petterson, B.; Westermark, U. (1974): Oxidation: An Important Enzyme Reaction in Fungal Degradation of Cellulose. FEBS Letters 49, 282-285

Everaerts, F.M.; Beckers, J.L.; Verheggen, T.P.E. (1976): Isotachophoresis: Isotachophoresis, Theory Instrumentation and Applications. Journal of Chromatography Library Vol. 6, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-Oxford-New York

Fairbanks, G.; Steck, T.L.; Wallach, D.F.H. (1971): Electrophoretic Analysis of the Major Polypeptides of the Human Erythrocyte Membrane. Biochemistry 10, 2606-2616

Furlong, C.E.; Cirakoglu, C.; Willis, R.C.; Santy, P.A. (1973): A simple preparativ Polyacrylamide Gel Electrophoresis Apparatus: Purification of Three Branched Chain Amino Acid Binding Proteins from *E. coli*. Analytical Biochemistry 5, 297-311

Ghai, S.K. (1979): Cellulase Complex of *Trichoderma koningii*: Mode of Action of $C_1$-Component. Indian Journal of Experimental Biology 17, 772-774

Gong, C.S.; Ladisch, M.R.; Tsao, G.T. (1977): Cellobiose from *Trichoderma viride*: Purification, Properties, Kinetics and Mechanism. Biotechnol. Bioeng. 19, 959-981

Gornall, A.G.; Bardawill, C.J.; Maxima, M.D. (1949): Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction. J. of Biological Chemistry, 177, 751-766

Gritzali, M.; Brown, R.D.J. (1979): The Cellulase System of *Trichoderma* Relationship Between Purified Extracellular Enzymes from Induced or Cellulose-Grown Cells. Advances in Chemistry Series, Hydrolysis of Cellulase: Mechanism of Enzymatic and Acid Catalysis, Hrsg.: Brown, R.D.J.; Jurasek, L. 181, 237-260

Gübitz, G.; Frei, R.W.; Bethke, M. (1976): Fluorescence Densitometric Method for the Determination of Gluconic and Lactobionic Acid ("Sugar Acids") in Pharmaceutical Preparations. Journal of Chromatography 117, 337-343

Halliwell, G.; Griffin, M. (1973): The nature and mode of action of the cellulolytic component $C_1$ of *T. koningii* on nativ cellulose. Biochem. J. 135, 587-594

Herbert, D.; Phipps, P.J.; Strange, R.P. (1971): Chemical Analysis of Microbial Cells. Methods in Microbiology, Hrsg.: Norris, J.R.; Ribbons, D.W. Acadamic Press, London-New York 58, 210-310

Herr, D.; Luck, G.; Dellweg, H. (1978): Formation of Cellulases and Degradation of Cellulose by several Fungi. J. Ferm. Technol. 56, 273-278

Hess, K.; Mahl, H.; Gütter, E. (1957): Elektronenmikroskopische Darstellung großer Längsperioden in Cellulosefasern und ihr Vergleich mit Perioden anderer Fasern. Kolloid-Z. 155, 1-5

Hestrin, S. (1949): The Reaction of Acetylcholine and Other Carboxylic Acid Derivatives with Hydroxylamine and Its Analytical Application. J. of Biological Chemistry 180 249-261

Hiller, L.A.J.; Pascu, E. (1946): Cellulose Studies, VI. Determination of Carboxyl Groups in Cellulosic Materials. Textile Research Journal New York 16, 390-393

Hulme, M.A; Stranks, D.W. (1971): Regulation of Cellulase Production by *Myrothecium verrucaria* Grown on Noncellulosic Substrates. J. Gen. Microbiol. 69, 145-155

Inglin, M.; Feinberg, B.A.; Loewenberg, J.R. (1980): Partial Purification and Characterization of a New Intracellular ß-Glucosidase of *Trichoderma reesei*. Biochem. J. 185, 515-519

Jaenicke, L.(1966): Einführung in die Praxis des Biochemikers. Institut für Biochemie, Uni Köln.

Kim, M.H.; Ryu, D.D.Y.; Reese, E.T. (1982): Surface Deactivation of Cellulase and its Prevention. Enyzme Microb. Technol. 4, 99-104

Kubicek. C.P. (1981): Release of Carboxymethyl-Cellulase and ß-Glucosidase from Cell Walls of *Trichoderma reesei*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 13, 226-231

Libbert, E. (1975): Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 2. Aufl.

Lineweaver, H.; Burk, D. (1934): The Determination of Enzyme Dissoziation Constants. J. Am. Chem. Soc. 56, 658-666

Linko, M. (1977): An Evaluation of Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Materials. Adv. Biochem. Eng. 5, 25-31

Loewenberg, J.R.; Chapman, C.M. (1977): Sophorose Metabolism and Cellulase Induction in *Trichoderma*. Archives of Microbiology 113, 61-64

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951): Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chemistry 193, 265-275

Maguire, J.R. (1977): Kinetics of the hydrolysis of Cellobiose and p-nitrophenyl-ß-D-glucoside by Cellobiase of *Trichoderma viride*. Can. J. Biochem. 55, 19-26

Mandels, M. (1982): Cellulases. Annual Reports on Fermentation Processes, Vol. 5, Ed.: Tsao, G.T.; Flickinger, M.C.; Finn, R.K. New York, Academic Press, 35-79

Mandels, M.; Parrish, F.W.; Reese, E.T. (1962): Sophorose as an Inducer of Cellulase in *Trichoderma viride*. J. Bacteriol. 83, 400-408

Mandels, M.; Reese, E.T. (1957): Indution of Cellulase in *Trichoderma viride* as Influenced by Carbon Sources and Metals. J. Bacteriol. 73, 269-278

Mandels, M.; Reese, E.T. (1959): Biologically active inpurities in reagent glucose. Biochem. Biophys. Research Communs 1, 338-340

Mandels, M.; Reese, E.T. (1960): Induction of Cellulase in Fungi by Cellobiose. J. Bacteriol. 79, 816-826

Mandels, M.; Sternberg, D. (1976): Recent Advances in Cellulase Technology. J. Ferment. Technol. 54, 267-286

Mandels, M.; Weber, J. (1969): The Production of Cellulases. Cellulases and their Applications. Adv. in Chem. Ser. 95 Symposium, Atlantic City. Ed.: Hajny, G.J.; Reese, E.T. Am. Chem. Soc. Verlag, 391-413

Manley, R.S.J. (1964): Fine Structure of Native Cellulose Microfibrills. Nature 204, 1155

Maurer, H.R. (1971): Disc Elektrophoresis and related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Walter de Gruyter Berlin-New York

Moberg, U.; Hjalmarsson, S.; Arlinger, L.; Lundin, H. (1977): Electrofocusing and Isotachophoresis, Ed.: Radola, B.J.; Graesslin, D. Walter de Gruyter, Berlin-New York, 515-526

Moeller, P. (1972): Darstellung von 2.3.4.6.-Tetramethyl-D-Glucono-1,5-lacton. Liebigs Ann. Chem. 755, 191-193

Moeller, P. (1973): Über die enzymatische Spaltung von Cellobionsäure I. Hoppe-Seyler's-Z. Physiol.Chem. 354, 1271-1276

Moellering, H.; Bergmeyer, H.U. (1967): Enzymatische Bestimmung von D-Gluconsäure in Lebensmitteln. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 135, 198-203

Monod, J. (1956): Remarks on the Mechanism of Enzyme Induction Selected Papers in Molecular Biology by Jaques Monod, Ed.: Wolff, A.; Ullmann, A. Academic Press Inc. New-York 313-334

Nanda, M.; Bisavia, V.S.; Ghose, T.K. (19 ):Lokalization and Release Mechanism of Cellulases in *Trichoderma reesei* QM 9414. Biotechnol. Letters 4, 633-638

Nelson, N. (1944): A photometric Adaption of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. J. Biol. Chem. 153, 375-380

Nisizawa, T.; Suzuki, H.; Nakayama, M.; Nisizawa, K. (1971): Inductive Formation of Cellulose by Sophorose in *Trichoderma viride*. J. Biochem. 70, 375-385

Nisizawa, T.; Suzuki, H.; Nisizawa, K. (1971): De novo - Synthesis of Cellulase Induced by Sophorose in *Trichoderma viride* Cells. J. Biochem. 70, 387-393

Nisizawa, T.; Suzuki, H.; Nisizawa, K. (1972): Catabolite Repression of Cellulase Formation in *Trichoderma viride*. J. Biochem. 71, 999-1007

Nummi, M.; Niku-Paavola, M.-L.; Enari, T.-M.; Raunio, V. (1981): Isolation of Cellulases by Means of Biospezific Sorption on Amorphous Cellulose. Analytical Biochemistry 116, 137-141

Pettersson, L.G. (1975): The Mechanismus of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose by *Trichoderma viride*. Symp. Enz. Hydrol. Cellulose, Ed.: Bailey, M.; Enari, T.M.; Linko, M. Aulanko, Finnland, 255-261

Preston, R.D.; Cronshaw, J. (1958): Constitution of the Fibrillar and Non-Fibrillar Components of the Wall of *Valonia ventricosa*. Nature 181, 248-250

Rapp, P.; Grote, E.; Wagner, F. (1981): Formation and Localization of 1,4-ß-Glucanases and 1,4-ß-Glucosidases from *Penicillium janthinellum*. Appl. Envir. Microbiol. 41, 857-866

Reese, E.T. (1957): Biological Degradation of Cellulose Derivatives. Ind. Eng. Chem. 49, 89-97

Reese, E.T. (1976): History of Cellulose Program at the US Army Natic Development Center. Biotechnol. Bioeng. Symp. No.6 Ed.: Gaden, E.; Mandels, M.; Reese, E.T.; Spano, L. An Interscience Publication, New York

Reese, E.T. (1980): Shear Inactivation of Cellulase of *Trichoderma reesei*. Enzyme and Microbial Technology 2, 239-240

Reese, E.T.; Lola, J.E.; Parrish, F.W. (1969): Modified Substrates and Modified Products as Inducers of Carbohydrases. J. Bacteriol. 100, 1151-1154

Reese, E.T.; Maguire, A. (1971): Increase of Cellulase-Yiels by Addition of Surfactants to Cellobiose Cultures of *Trichoderma viride*. Developments in Industrial Microbiology 12, 212-224

Reese, E.T.; Mandels, M. (1960): Gluconolactone as an Inhibitor of Carbohydrases, Developments in Industrial Microbiology 6, 171-180

Reese, E.T.; Mandels, M. (1980): Stability of the Cellulase of *Trichoderma reesei* under Use Conditions. Biotechnol. Bioeng. 22, 323-335

Reese, E.T.; Parrish, F.W.; Ettlinger, M. (1971): Nojirimycin and D-Gluconolactone as Inhibitors of Carbohydrases. Carbohydrate Research 18, 381-388

Reese, E.T.; Siu, R.G.H.; Levinson, H.S. (1950): The Biological Degradation of Soluble Cellulose Derivatives and Its Relationship to the Mechanism of Cellulose Hydrolysis. J. Bacteriol. 59, 485-497

Rho, D.; Desrochers, M.; Jurasek, L.; Driguez, H.; Defaye, J. (1982): Induction of Cellulase in *Schizophyllum commune*, Thiocellobiose as a New Inducer. J. Bacteriol. 149, 47-53

Ruske, W. (1970): Einführung in die organische Chemie. 2. Aufl. Verlag Chemie GmbH, Weinheim

Ryu, D.D.R., Mandels, M. (1980): Cellulase: Biosynthesis and Applications. Enzyme Microb. Technol. 2, 91-102

Saad, A.A. (1978): Induktionswirkung der bei der Cellulose-Fermentation mit *Aspergillus niger* entstehenden Reductone und Lactone auf das cellulolytische System von *Trichoderma viride* (*reesei*). Dissertation an der UNI Hohenheim

Sahm, H. (1979): Pflanzliche Rückstände als Substrate für die Biotechnologie. Forum Mikrobiologie 4,177-182

Sahm, H.; Schoberth, S. (1978/79): Mikrobielle Umsetzung von pflanzlichen Rückständen. Jahresbericht der KFA-Jülich

Schmidt, E. (1965): Chlordioxid in seinem Verhalten gegen die pflanzliche Zellwand und natürliche Eiweißstoffe. Papier 19, 728-735

Schmidt, E.; Atterer, M.; Schnegg, H. (1931): Das Mindest-Äquivalent von ß-Cellulose, Tunicin, Cellulose der Baumwolle. Naturwissenschaften 19, 1006-1007

Schmidt, E.; Meinel, K.; Jandebeur, W.; Simson, W. (1932): Die Kettenlänge der Cellulosen nativer Zusammensetzung und die Kettenlänge des Acetyl-Xylans der Laubhölzer. Cellulose-Chemie 13, 129-139

Selby, K. (1968): Mechanisms of Biodegradation of Cellulose. Biodeterioration of Materials, Vol. 1, Ed.: Walters, A.H. Elphick, J.J.; Elsevier, London, 62-70

Selby, K.; Maitland, C.C. (1967): The Cellulase of Trichoderma reesei. J. Biochem. 104, 716-724

Sithola, H.; Neimo, L. (1975): The Structure and Properties of Cellulose. Symp. of Enz. Hydrol. of Cellulose, Ed.: Bailey, M.; Enari, T.M.; Linko, M. The finnish National Fund for Research and Development, Sitra, Helsinki, 9-21

Siu, R.G.H.; Reese, E.T. (1953): Decomposition of Cellulose by Microorganisms. The Botanical Review 19, 377-416

Shewale, J.G. (1982): ß-Glucosidase: Its Role in Cellulase Synthesis and Hydrolysis of Cellulose. Int. J. Biochem. 4, 435-443

Shin, S.B.; Kitagawa, Y.; Suga, K.; Ichikawa, K. (1978): Cellulase Biosynthesis by *Trichoderma viride* on Soluble Substrates. J. Ferment. Technol. 56, 396-402

Simmons, E.G. (1977): Classification of some cellulase producing *Trichoderma* spezies. Abstracts of Second Int. Mycological Congress Tampa, Florida, USA, Ed.: Aigelow, H.E,; Simmons, E.G. 618

Somogyi, M. (1952): Notes on Sugar Determination. J. Biol. Chem. 195, 19-23

Spano, L.A. (1976): Enyzmatic Hydrolysis of Cellulosic Materials in Microbial Energy Conversion. Ed.: Schlegel, H.G.; Barnea, J.; Verlag Erich Goltze, Göttingen,157-178

Spiro, R.G. (1970): Glycoproteins, A. Rev. Biochem. 39, 599-638

Sternberg, D. (1976): ß-Glucosidase of *Trichoderma*: Its Biosynthesis and Role in Saccharification of Cellulose. Appl. Envir. Microbiol. 31, 648-654

Sternberg, D.; Mandels, G.R. (1979): Induction of Cellulolytic Enzymes in *Trichoderma reesei* by Sophorose. J. Bacteriol. 139, 761-769

Sternberg, D.; Mandels, G.R. (1980): Regulation of the Cellulolytic System in *Trichoderma reesei* by Sophorose: Induction of Cellulase and Repression of ß-Glucosidase. J. Bacteriol. 144, 1197-1199

Sternberg, D.; Mandels, G.R. (1982): ß-Glucosidase Induction and Repression in the Cellulytic Fungus, *Trichoderma reesei*. Experimental Mycology 6, 115-124

Streamer, M.; Eriksson, K.E.; Pettersson, B. (1975): Extracellular Enzyme System Utilized by the Fungus *Sporotrichum pulverulentum (Chrysosporium lignorum)* for the Breakdown of Cellulose. Eur. J. Biochem. 59, 607-613

Targoński, Z.; Szajer, C. (1979): The Dynamics of Cellulase Synthesis in *Fusarium* Cultures: Influence of Cellulose Concentration in The Culture Media. Biotechnol. Zeit. 1, 439-444

Teuscher, A.; Richterich, R. (1971): Neue schweizerische Richtlinien zur Diagnose des Diabetes Mellitus. Schweiz. med. Wschr. 101, 345-352, 390-398

Vaheri, M.D. (1983): Acidic Degradation Products of Cellulose During Enzymatic Hydrolysis by *Trichoderma reesei*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. (in Vorbereitung)

Vaheri, M.; Leisola, M.; Kauppinen, V. (1979): Transglycosylation Products of *Trichoderma reesei*. Biotechnol. Letters 1, 41-46

Vaheri, M.P.; Vaheri, M.E.O.; Kauppinen, V.S. (1979): Formation and Release of Cellulolytic Enzymes During Growth of *Trichoderma reesei* on Cellobiose and Glycerol. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 8, 73-80

Voelter, W. (1974): Zucker-Borat-Komplexe:Struktur, Nachweismethoden und Anwendungen. 50. Mitteilung über Kohlenhydrate 98, 493-498

Voelter, W.; Bauer, T.; Hofmann, H. (1974): Hydrolyse und Trennmethoden von Kohlenhydraten. Fachzeitung für das Laboratorium, 331-334; 444-446

Wagner, F.; Sistig, P. (1979): Verwertung von Cellulose durch Mikroorganismen. Forum Mikrobiologie 2, 74-80

Westermark, U.; Eriksson, K.E. (1974): Carbohydrate-dependent Enzymic Quinone Reduction during Lignin Degradation. Acta Chemica Scandinavica B 28, 204-208

Westermark, U.; Eriksson, K.E. (1974): Cellobiose: Quinone Oxidoreductase, a New Wood-degrading Enzyme from White-rot Fungi. Acta Chemica Scandinavica B 28, 209-214

Westermark, U.; Eriksson, K.E. (1975): Purification and Properties of Cellobiose: Quinone Oxidoreductase from *Sporotrichum pulverulentum*. Acta Chemica Scandinavica B 29, 419-424

Westermark, U.; Eriksson, K.E. (1975): Acidic cellulose degradation products from Wood attacked by *Sporotrichum pulverulentum*. Svensk Papperstidning 18, 653-656

Wood, T.M. (1971): The Cellulase of *Fusarium solani* Purification and Specifity of the ß-1,4-Glucanase and the ß-D-Glucosidase Components. Biochem. J. 121, 353 - 362

Wood, T.M. (1972): The C1-component of Cellulase-Komplex. Fermentation Technology Today. Proc. IV, Int. Ferm. Symp. Ed.: Terai, A.; Kyoto, Japan, 711-718

Wood, T.M. (1975): Properties and Mode of Action of Cellulases. Cellulase as Chemical and Energy Resource, Ed.: Wilke, C.R., Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 5, Wiley, New York, 111-137

Wood, T.M.; McCrae, S.I. (1972): The Purification and Properties of the $C_1$-Component of *Trichoderma koningii* Cellulases. Biochem. J. 128, 1183-1192

Wood, T.M.; McCrae, S.I. (1977): The Mechanism of Cellulase Action with particular reference to the $C_1$-component. Bioconversion of Cellulsic Substances into Energy. Chemicals an Microbial Protein. Ed.: Ghose, T.K.; Aroon Purcat Thomson Press, India, 111-141

Wood, T.M.; McCrae, S.I. (1978): The Cellulases of *Trichoderma koningii* Purification of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with cellobiohydrolase. Biochem. J. 171, 61-72

# Lebenslauf

| | |
|---|---|
| 22.7.1953 | geboren in Niederzier-Lich |
| 1960 - 1964 | Besuch der Grundschule in Niederzier-Lich |
| 1964 - 1972 | Besuch des staatl. humanistischen Gymnasiums in Jülich mit abschliessendem Abitur |
| Juli 1972 - Juni 1974 | Ableistung des Wehrdienstes als Zeitsoldat im Sanitätsdienst |
| Oktober 1974 - Februar 1979 | Studium der Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelm Universität in Bonn bis zur mündlichen Diplom-Biologen-Hauptprüfung; Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Pflanzenphysiologie, Chemie |
| Mai 1976 | Diplom-Biologen-Vorprüfung |
| März 1979 - Mai 1980 | Diplomarbeit zum Thema "Untersuchungen zur Cellobioseoxidase von Trichoderma reesei" unter Leitung von Prof. Dr. H. Sahm im Institut für Biotechnologie 1 der Kernforschungsanlage Jülich |
| ab Juni 1980 | Arbeit an der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. H. Sahm im Institut für Biotechnologie 1 der Kernforschungsanlage Jülich |